

**PRODUKTION UND IMMUNOCHEMISCHE DARSTELLUNG
DER BINDUNGSEIGENSCHAFTEN MONOKLONALER
ANTIKÖRPER GEGEN SPONTANE HIRNTUMOREN DES
HUNDES**

H. DIETMAR SCHMITT

1986



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547927_0096

Aus dem

Institut für Tierpathologie der Universität München

Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie

Vorstand Prof. Dr. E. Dahme

PRODUKTION UND IMMUNOCHEMISCHE DARSTELLUNG

DER BINDUNGSEIGENSCHAFTEN MONOKLONALER ANTIKÖRPER

GEGEN SPONTANE HIRNTUMOREN DES HUNDES

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der

Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

H. Dietmar Schmitt

aus Dudweiler

München 1986

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan : Prof. Dr. H. Zucker

Referent: Prof. Dr. E. Dahme

Koreferent: Prof. Dr. Dr. h.c.mult A. Mayr

Tag der Promotion: 25. Juli 1986

Inhaltsübersicht

	Seite
A. Einleitung und Problemstellung	1
B. Literaturübersicht	3
1. Monoklonale Antikörper in der Neuroonkologie	3
2. Immunochemische Methoden zur Darstellung monoklonaler Antikörper	7
3. Monoklonale Antikörper in der Immunelektronenmikroskopie	10
C. Eigene Untersuchungen	14
1. Material und Methoden	14
1.1. Versuchstiere	14
1.2. Tumoren	14
1.2.1. Primärtumoren	14
1.2.1.1. Histologie	15
1.2.1.2. Immunhistologie	15
1.2.1.3. Elektronenmikroskopie	16
1.2.2. Zellkulturen	16
1.2.2.1. Kultivation	16
1.2.2.2. Behandlung mit DB-cAMP	17
1.2.2.3. Immunochemische Untersuchung	17
1.2.2.4. Nachweis und Elimination von Mycoplasmen	18
1.2.3. Transplantationstumoren	18
1.3. Produktion und Charakterisierung monoklonaler Antikörper	19
1.3.1. Immunisierung	19
1.3.2. Zellfusionen	20
1.3.3. Nachweis gliombindender Antikörper	22
1.3.3.1. Micro-ELISA	22
1.3.3.2. Indirekte Immunperoxidasefärbung (IPF)	23

1.3.4.	Klonierung von Hybridomen	24
1.3.5.	Konservierung von Hybridomen	24
1.3.6.	Verwendung weiterer monoklonaler Antikörper	25
1.3.7.	Antikörperselektion	25
1.3.8.	Untersuchung von Kreuzreaktionen	26
1.3.9.	Anreicherung von Immunglobulinen durch Ammoniumsulfatpräzipitation aus serumfreien Hybridomüberständen	26
1.3.10.	Bestimmung der Immunglobulinisotypen und -subklassen	27
1.3.11.	Fixierung der Zielzellen	27
1.4.	Lichtmikroskopische Darstellung der Anti- körperbindung	28
1.4.1.	Zellkulturen	28
1.4.2.	Gewebeschnitte	29
1.5.	Elektronenmikroskopische Darstellung der Antikörperbindung	30
1.5.1.	Preembedding-Verfahren	30
1.5.1.1.	Tumorzellen	31
1.5.1.2.	Transplantationstumoren	31
1.5.2.	Postembedding-Verfahren	33
2.	Ergebnisse	35
2.1.	Tumoren	35
2.1.1.	Tumor N 166/77	35
2.1.2.	Tumor N 422/83	36
2.2.	Zellkulturen	37
2.3.	Transplantationstumoren	38
2.4.	Produktion und Charakterisierung mono- klonaler Antikörper	41
2.4.1.	Hybridome	41
2.4.2.	Kreuzreaktionen mit Tumorzellen verschie- dener Species	45
2.4.3.	Immunglobulinisotypen und -subklassen	47
2.4.4.	Stabilität der Gliomantigene	47

2.5.	Immunochemische Darstellung der Antikörper- bindung	49
2.5.1.	Lichtmikroskopie und Preembedding-Verfahren	49
2.5.1.1.	Gliomzellen	49
2.5.1.2.	Gewebeschnitte	50
2.5.2.	Postembedding-Verfahren	52
D.	Diskussion	58
E.	Zusammenfassung - Summary	66
F.	Literaturverzeichnis	70

A. Einleitung und Problemstellung

Die Tumorzelloberfläche und ihre Antigenstruktur war in den vergangenen Jahren Gegenstand intensiver onkologischer Forschungen. Hierbei galt das Interesse vor allem dem Nachweis von tumor-assoziierten Zelloberflächenantigenen, die eine immunologische Abwehrreaktion des Tumorträgers hervorrufen können. Daß auch neurogene Tumoren spezifische Antigene exprimieren, kann aufgrund von Untersuchungen der humoralen und zellvermittelten Immunantwort bei spontanen (Kornblith et al., 1974; Wahlström et al., 1974; Wikstrand et al., 1977; Pfreundschuh et al., 1978) und experimentellen (Stavrou et al., 1978; Bilzer et al., 1982) Gliomen angenommen werden.

Seit der Einführung der Hybridomtechnik durch Köhler und Milstein (1975) können einzelne antigene Determinanten durch monospezifische Antikörper lokalisiert und charakterisiert werden. Dies ermöglichte den sicheren Nachweis tumor-assoziiierter Antigene bei einer Vielzahl von Neubildungen, so auch bei humanen Gliomen und Neuroblastomen.

Das Tumorgeschehen bei neuroektodermalen Geschwülsten des Hundes ist weitgehend mit den Verhältnissen beim Menschen vergleichbar (lit. bei Dahme et al., 1980). Es ist daher zu erwarten, daß diese Tumoren durch Untersuchungen mit monoklonalen Antikörpern näher charakterisiert werden können. Die in vitro Züchtung von Tumorzellen ermöglicht das Studium der Antigen-Antikörperreaktion unter standardisierten Bedingungen, wobei das Bindungsverhalten einzelner monoklonaler Antikörper ebenso von Interesse ist wie deren Auswirkung auf das in vitro Verhalten der Tumorzellen. Daneben können mit kultivierten, tumorogenen Zellen in thymuslosen BALB/c-nu/nu-Mäusen Transplantationstumoren erzeugt werden,

die ein geeignetes Modell für die Immunhistochemie mit monoklonalen Antikörpern darstellen. Unter Auffindung geeigneter Nachweismethoden werden damit Voraussetzungen für den Einsatz monoklonaler Antikörper in der histopathologischen Diagnostik neurogener Tumoren geschaffen. Der Nachweis gliom-assoziiierter Antigene wiederum stellt die Grundlage für die künftige Anwendung monoklonaler Antikörper zur in vivo Immundiagnostik und -therapie von Gehirntumoren dar.

8. Literaturübersicht

1. Monoklonale Antikörper in der Neuroonkologie

Schon bald nach der Einführung der Hybridomtechnik durch Köhler und Milstein (1975) wurden monoklonale Antikörper (MAK) dazu verwendet, einzelne Elemente des zentralen und peripheren Nervensystems aufgrund ihrer unterschiedlichen Antigenstrukturen voneinander zu unterscheiden. Hierbei sind es vorwiegend biochemisch noch nicht charakterisierte Differenzierungsantigene, deren Lokalisation durch MAK die Zuordnung einzelner Zellen zu bestimmten Zelllinien ermöglicht (Lagenauer et al., 1981; Hirn et al., 1982; Hawkes et al., 1982). Darüber hinaus existieren inzwischen MAK gegen eine Reihe biochemisch weitgehend definierter "Marker"-Substanzen, darunter das saure Gliafaserprotein GFAP (glial fibrillary acidic protein, Eng et al., 1971; Collins et al., 1983; Gheuens et al., 1984; Albrechtsen, 1984), das vorwiegend in Gliazellen vorhandene Protein S-100 (soluble in 100% Ammoniumsulfat, Moore et al., 1965; Löffel et al., 1985), den Oligodendrozyten-Marker Galactocerebroside (GC, Ranscht et al., 1982), Neurofilament-Protein und Myelin-Basic-Protein (Trojanowski et al., 1979; 1983) sowie gegen die Neurotransmittersubstanzen Serotonin (Consolazione et al., 1981) und das neuron-spezifische Polypeptid "Substanz P" (Cuello et al., 1979). Zur Darstellung dieser komplexen Antigene werden in der neuropathologischen Diagnostik allerdings herkömmliche polyvalente Antiseren noch bevorzugt eingesetzt, da sie aufgrund ihrer - gegenüber monospezifischen Antikörpern - größeren Reaktionsbreite die Sensitivität immunochemischer Methoden erhöhen. Dieser Nachteil von MAK könnte ausgeglichen werden durch Verwendung von "Cocktails" aus

verschiedenen MAK, die unterschiedliche Epitope eines komplexen Antigens erkennen (Trojanowski et al., 1983). Bei der Suche nach tumor-assoziierten Antigenen (TAA) in der immunologischen Untersuchung neuroektodermaler Tumoren ist jedoch die Monospezifität von MAK eine entscheidende Voraussetzung für den histochemischen Nachweis einzelner antigener Determinanten, die erst zu einem kleinen Teil durch biochemische Merkmale wie Stoffklasse und Molekulargewicht charakterisiert werden konnten (antikörper-definierte Antigene). Die Annahme, daß Tumorzellen eine gegenüber normalen Zellen veränderte Antigenstruktur besitzen können, kann heute als gesichert gelten (Klein, 1966; Hellström et al., 1968; Old et al., 1969; Baker et al., 1973; Herbermann, 1977). Die Existenz gliom-assoziiierter Antigene ist durch Untersuchungen der humoralen und zellulären Immunantwort sowohl bei Tumorpatienten (Wahlström et al., 1973; Kornblith et al., 1974; Solheid et al., 1976; Pfreundschuh et al., 1978; Coakham et al., 1980), als auch bei experimentellen Gliomen (Cravioto, 1978; Stavrou et al., 1978; Bilzer et al., 1982) sowie durch die Herstellung von Heteroantisera gegen Gliome (Trouillas, 1971; Coakham, 1974; Wahlström et al., 1974; Coakham und Lakshmi, 1975; Kehayov, 1976; Wikstrand et al., 1977) nachgewiesen worden. Die Verwendung von Heteroantisera zur Untersuchung von gliom-assoziierten Antigenen in Spontanumorgewebe setzte jedoch umfangreiche Absorptionen mit normalen Geweben (Coakham, 1974; Wikstrand und Bigner, 1979; Schnegg et al., 1981) voraus, um Antikörper gegen Histokompatibilitätsantigene zu entfernen; die Reingewinnung spezifischer Antikörper bei ausreichend hohem Titer war dennoch mit dieser Methode nicht möglich. Mit der Hybridomtechnik können Antikörper gegen einzelne Determinanten in unbegrenzter Menge hergestellt werden.

Durch geeignete Klonierungs- und Selektionsverfahren können aus einer Gesamtpopulation antikörper-produzierender Zellen solche Klone isoliert werden, die monospezifische Antikörper gegen tumor-assoziierte Antigene produzieren.

Wikstrand und Bigner (1985) teilen die bisher bekannten, durch MAK erkannten TAA humaner neuroektodermaler Tumoren in vier Gruppen ein:

a) Biochemisch definierte Marker

Dazu gehören die Proteine GFAP und S-100, Galactocerebroside als Differenzierungsmarker von Oligodendrozyten und Schwann'schen Zellen sowie verschiedene Ganglioside in der Membran von Gliom-, Melanom- und Neuroblastomzellen (Cahan et al., 1982; Pukel et al., 1982; Dippold et al., 1984).

b) Gemeinsame Antigene von neuroektodermalen und lymphatischen Zellen

Eine Antigenverwandtschaft von Nervengewebe und Lymphapparat wurde bereits 1964 mit Hilfe polyvalenter Antiseren festgestellt (Reif und Allen, 1964). Inzwischen werden eine Reihe gemeinsamer Antigene von Zellen des lymphatischen Systems einerseits und neuroektodermalen Zellen andererseits durch MAK erkannt: HLA-DR (Carrel et al., 1982), CALLA (Carrel et al., 1983), OKT-8 (Oger et al., 1982), PNET (Helson et al., 1983), M22 (Dippold et al., 1980), P1153 (Kennett et al., 1980; Seeger et al., 1981) und Thy-1 (Seeger et al., 1982).

c) Gemeinsame neuroektodermale und onkofetale Marker

Hierzu zählen gemeinsame, durch MAK definierte Antigene von Gliomen, Melanomen, Neuroblastomen und Schwannomen (Herlyn et al., 1980; Schnegg et al., 1981a; deTribolet

et al., 1982; Carrel et al., 1982; Saxton et al., 1983) sowie Antigene, die außer bei neuroektodermalen Tumoren auch bei Karzinomen (Dippold et al., 1980; Hellström et al., 1983), Sarkomen (Bourdon et al., 1983) und Meningiomen (Schnegg et al., 1981b) gefunden werden. Eine ganze Reihe weiterer MAK reagiert außer mit den genannten Tumorzellarten auch mit fetalen Geweben (Kennett und Gilbert, 1979; Dippold et al., 1980; Brown et al., 1981; Seeger et al., 1981; Wikstrand, 1982).

d) Vermutlich nur bei bestimmten Tumoren vorhandene tumorspezifische Antigene

Nur wenige der bisher bekannten MAK reagieren nur mit der zur Immunisierung verwendeten Tumorzellart. Sie wurden bisher bei humanen Melanomen (Houghton et al., 1983) und Gliomen (Sikora und Alderson, 1982;) sowie bei experimentellen Gliomen (Stavrou et al., 1983; Lee et al., 1984) beschrieben.

2. Immunochemische Methoden zur Darstellung monoklonaler Antikörper

Der Einsatz von MAK bei immunochemischen Untersuchungen erfordert aufgrund ihrer hohen Spezifität die Verwendung hochempfindlicher Nachweismethoden. Die gesuchten Antigene, insbesondere membran-assoziierte Antigene, sind im untersuchten Gewebe oft nur in geringer Dichte vorhanden und können durch Fixation und Einbettung ganz oder teilweise denaturiert bzw. maskiert werden. Grundsätzlich können aber zur Darstellung von MAK dieselben immunhistochemischen Methoden verwendet werden wie zur Immunhistochemie mit polyvalenten Antiseren. Neben der direkten (Coons et al., 1941) und indirekten Immunfluoreszenz (Nash et al., 1969) werden zur Darstellung von MAK heute vorwiegend immunenzymatische Techniken angewendet, wobei der nachzuweisende Antikörper entweder direkt mit einem Enzym (Peroxidase, alkalische Phosphatase) gekoppelt wird (direkte Methode, Nakane und Pierce, 1966; Avrameas, 1969), oder in einer zweistufigen (z.B. indirekte Immunperoxidasefärbung, Pearse, 1972) oder mehrstufigen Reaktion (Sternberger, 1969; Mason et al., 1969) durch gegen den ersten Antikörper gerichtete, ihrerseits enzym-gekoppelte Antikörper markiert wird. Das Enzym katalysiert die Umsetzung eines geeigneten Substrats, woraus eine Farbreaktion resultiert. Als Substrat werden überwiegend 3,3'-Diaminobenzidin (DAB, Graham und Karnovsky, 1966) und 3-amino-9-äthyl-Carbazol (AEC, Graham et al., 1965) verwendet, daneben stehen, insbesondere für die simultane Darstellung mehrerer Antigene, noch weitere Substanzen zur Verfügung: O-Toluidin (Somogyi et al., 1979), Fast-red-violet (FRV) und Fast-blue-8B-salt (Boorsma, 1984), alpha-Naphtol und 4-Cl-1-Naphtol (Nakane, 1968), Benzidin (Straus, 1972) u.a.m.

Die immunenzymatischen Techniken wurden in den letzten Jahren vielfach modifiziert mit dem Ziel, Sensitivität und Spezifität zu steigern (Übersicht bei Falini und Taylor, 1983); insbesondere gewinnen die Koppelung von Enzymen an Protein-A (Celio et al., 1979; Falini et al., 1980; Trost et al., 1980), Hapten-gekoppelte Antikörper (Farr und Nakane, 1981; Ponder und Wilkinson, 1981; Jasani et al., 1981) sowie die Avidin-Biotin-Methode (Hsu et al., 1981) zunehmend an Bedeutung. Bei diesem System macht man sich die hohe Bindungsaffinität zwischen Avidin und Biotin zunutze. Ein Biotin-gekoppelter Antikörper wird mit Avidin, das über mehrere Bindungsstellen für Biotin verfügt, zur Reaktion gebracht. Die restlichen Bindungsstellen des Avidins sind mit Enzym- oder Ferritin-markiertem Biotin besetzt. Auf diese Weise wird die Markierungskapazität erhöht, und das System erweist sich dem PAP-System gegenüber zunehmend als gleichwertig oder sogar überlegen.

Von den genannten Methoden hat die Peroxidase-anti-Peroxidase-Technik (PAP, Sternberger, 1969) die bisher größte Verbreitung gefunden, da sie bei hoher Spezifität und Sensitivität reproduzierbare Ergebnisse bei verschiedensten Fragestellungen, so auch bei der Darstellung von MAK, liefert. Die Methode beruht darauf, daß ein ungekoppelter erster Antikörper, nachdem er sich immunologisch an das entsprechende Antigen gebunden hat, über einen Brückenantikörper mit einem Antikörper-Peroxidase-Komplex verbunden und so nachgewiesen wird. Da zur Produktion monoklonaler Antikörper überwiegend sensibilisierte Plasmazellen der Maus verwendet werden, können diese, seit der Einführung eines murinen monoklonalen PAP - Komplexes (Zagury et al., 1979), ohne Einschaltung von Zwischenstufen mit der 3-Schritt-PAP-Technik nachgewiesen werden. Die Empfindlichkeit

der Methode liegt um den Faktor 100 bis 1000 über der indirekten Immunfluoreszenz (Sternberger, 1979). Durch die Verwendung jeweils geeigneter Substrate kann die Methode sowohl in der Licht- als auch in der Immun-elektronenmikroskopie angewendet werden.

In Abbildung 1 sind die gebräuchlichen Immunperoxidase-Techniken sowie die Avidin-Biotin-Methode schematisch dargestellt.

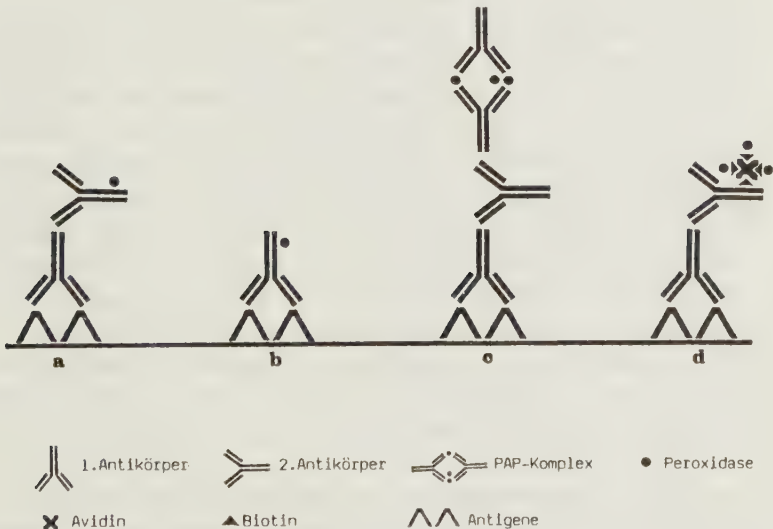


Abb. 1: Schematische Darstellung immunhistochemischer Nachweismethoden

- a) indirekte - b) direkte Immunperoxidasefärbung
c) PAP-Methode d) Avidin-Biotin-System

3. Monoklonale Antikörper in der Immuielektronenmikroskopie

Zur ultrastrukturellen Darstellung monoklonaler Antikörper können einige der angeführten immunologischen Verfahren in modifizierter Form verwendet werden. Als Äquivalent zum farblich erkennbaren Substrat dient die Markierung von Antikörpern mit einem elektronendichten Material. Hierzu eignen sich kolloidal gelöste Goldpartikel (Deryagin und Landau, 1941), die über Protein A-Moleküle mit dem zu lokalisierenden Antikörper gekoppelt werden (Faulk und Taylor, 1971) sowie Ferritin, dessen Moleküle über 2000 Eisenatome enthalten (Nicolson und Singer, 1971; Morgan, 1972; Sternberger, 1979). In Verbindung mit Immunperoxidase-Techniken eignet sich als Substrat 3,3'-Diaminobenzidin (Graham und Karnovsky, 1966), das nach Reaktion mit Osmium wasserunlösliche, elektronendichte Chelatkomplexe bildet. Da das Reaktionsprodukt jedoch im Elektronenmikroskop (EM) bedeutend schwieriger zu lokalisieren ist als Metallpartikel, sollte bei dieser Methode auf eine Kontrastierung der Schnitte mit Blei- und Uranylsalzen verzichtet werden (Priestley und Cuello, 1983).

Zur Darstellung von Antigenen im EM stehen zwei Wege zur Verfügung (Abbildung 2), deren Vor- und Nachteile gegeneinander abzuwägen sind:

a) Bei der Preembedding-Technik (Pickel et al., 1975) erfolgt die immunochemische Färbung an fixierten oder unfixierten Gewebeschnitten bzw. Zellkulturen vor der Dehydratation und Einbettung. Auf diese Weise bleibt die Antigenstruktur des Gewebes während der Färbung weitgehend erhalten, so daß auch labile Antigene erfaßt werden können. Das Hauptproblem der Methode beruht auf der mangelhaften Durchdringung dickerer Gewebeschichten

durch die zur Färbung benötigten Reagenzien sowie auf der Undurchlässigkeit von intakten Zellmembranen für größere Proteinmoleküle, wie zum Beispiel enzymgekoppelte Antikörper. Zur Darstellung intrazellulärer Antigene ist daher eine Vorbehandlung des Gewebes erforderlich. Durch Inkubation in Triton X-100 (DeMey et al., 1976), hohe pH-Werte der Antikörper-Lösungen (Pickel, 1981) oder mehrmaliges Einfrieren und Auftauen des Gewebes (Sternberger, 1979) kann die Permeabilität von Zellmembranen für Antikörper erhöht werden.

b) Bei der Postembedding-Technik erfolgt die immunchemische Färbung am bereits eingebetteten, semi- oder ultradünn geschnittenen Gewebe. Zellen und Zellorganellen sind angeschnitten und für Ak-Lösungen frei zugänglich. Allerdings ist es bei der Verwendung von hydrophoben Einbettungsmedien (Epon, Araldit u.a.) erforderlich, die Oberfläche der Schnitte vor der Färbung durch Inkubation in Wasserstoffsuperoxid (Sternberger, 1979) oder anderen Lösungsmitteln anzuzüchten, um den Kontakt der Antikörper mit den Zellantigenen zu ermöglichen; labile Antigene können dabei zerstört werden. Bei der Einbettung in hydrophile Methacrylatharze kann dieser Schritt entfallen, so daß die Antigenität des Gewebes besser erhalten bleibt (Newman et al., 1982). Entscheidend ist auch die Wahl geeigneter Fixative, die einerseits die Ultrastruktur, andererseits auch die Antigenität des Gewebes weitgehend erhalten sollen. Gut bewährt haben sich Kombinationen von Formaldehyd (1-4%) und Glutaraldehyd (0,5-2%, Pickel et al., 1976; Weber et al., 1978; Buijs und Swaab, 1979; Broadwell et al., 1979; Priestley et al., 1982;), Perjodat-Lysin-Paraformaldehyd - Fixative (McLean und Nakane, 1974) sowie Pikrinsäure-Paraformaldehyd-Glutaraldehyd - Mischungen (Zamboni und deMartino, 1967), die modifiziert wurden

für die Elektronenmikroskopie (Somogyi und Takagi, 1982). Dennoch ist ein Großteil empfindlicher Antigene, darunter besonders Enzyme und die oft nur in geringer Dichte vorhandenen membran-assoziierten Antigene, nach Fixation, Dehydration und Einbettung nicht mehr nachweisbar (Sternberger, 1979; Priestley und Cuello, 1983).

Preembedding-Technik	Postembedding-Technik
Gewebe-Fixation	Gewebe-Fixation
⋮	⋮
20-40 µm-Schnitte	Kunstharz-Einbettung
⋮	⋮
immunochemische Färbungen	Ultradünnschnitt
⋮	⋮
Kunstharz-Einbettung	immunochemische Färbungen
⋮	⋮
Semi- und Ultra-dünnschnitt	EM-Auswertung
⋮	
EM-Auswertung	

Abb. 2: Schematische Darstellung von Pre- und Postembedding-verfahren (nach Priestley und Cuello, 1983)

Die elektronenmikroskopische Darstellung von Bindungsstellen monoklonaler Antikörper gelang bisher überwiegend unter Verwendung von Preembedding-Techniken. Auf diese Weise konnten membran-assoziierte Antigene an Zellpräparationen mit Immunogold- (Bourguignon et al., 1982; De Waele et al., 1983; De Waele 1984; Manara et al., 1984; Coppe et al., 1985) und Immunperoxidase-Techniken (Fields und Raine, 1982; van der Weij et al., 1983; van Duinen et al., 1984; Manara et al., 1984) sowie an Gewebeschnitten mittels der PAP-Technik (Hirn et al., 1982; Hansmann et al., 1984) dargestellt werden. Goodman und Newman (1983) konnten Zelloberflächenantigene mit einer Immunogold-Technik im Scanning-Elektronenmikroskop sichtbar machen. Clevenger und Epstein (1984) gelang die Darstellung von MAK gegen intrazelluläre (Zellkern-) Antigene mittels einer Postembedding-Immunogold-Technik. Von MAK erkannte membran-assoziierte Antigene konnten dagegen mit Postembedding-Verfahren bisher noch nicht überzeugend dargestellt werden.

C. Eigene Untersuchungen

1. Material und Methoden

1.1. Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten BALB/c-Mäuse beiderlei Geschlechts sowie 6-8 Wochen alte, weibliche BALB/c-nu/nu-Mäuse. Die Standarddiät der BALB/c-Mäuse bestand aus Altromin^R und Wasser ad libitum. Die Nacktmäuse wurden unter aseptischen Bedingungen bei 25-26°C gehalten, ihre Standarddiät bestand aus Altromin 1414^R - Sonderanfertigung für Nacktmäuse und Nacktratten- und aus mit HCl auf pH 3,0 angesäuertem Wasser ad libitum.

1.2. Tumoren

1.2.1. Primärtumoren

Im Mittelpunkt dieser Untersuchungen standen zwei spontane Gehirntumoren des Hundes:

a) Der Tumor N 166/77 (Müller, 1978; Dahme et al., 1980) stammt aus dem Gehirn einer 7¹/₂-jährigen Boxerhündin. Er war lokalisiert im rechten lobus piriformis, etwa kirschgroß, unscharf begrenzt, von grauweißer Farbe und mit einzelnen petechialen Blutungen durchsetzt.

b) Der Tumor N 422/83 stammt aus dem Gehirn einer 5-jährigen Boxerhündin. Makroskopisch handelt es sich um einen etwa kirschgroßen, weißlichen, wenig nekrotischen und peripher zerfließlich-sulzigen Tumor mit Sitz in der rechten Großhirnhemisphäre, der frontal vom Seitenventrikel bis zur Meninx reicht.

1.2.1.1. Histologie

Für die histologische Untersuchung wurden Teile der Gehirntumoren in 6%igem neutralen Formalin fixiert und in Paraplast^R eingebettet. 8 µm dicke Schnitte wurden angefertigt und mit Hämatoxilin-Eosin, Luxol Fast Blue und nach NISSL gefärbt.

1.2.1.2. Immunhistologie

Die Tumoren wurden immunochemisch auf Expression der Markersubstanzen GFAP, S-100, Neuronen-spezifische Enolase (NSE) und Fibronektin untersucht. Der Nachweis erfolgte durch eine 3-Schritt-PAP-Technik nach folgendem Schema:

- Entparaaffinieren der Schnitte in Xylol
- Dehydration in absteigender Alkoholreihe
- Inaktivierung der endogenen Peroxidase mit 1%iger H_2O_2 /Methanol-Lösung, 10 min
- Präinkubation in normalem Schweineserum, 1:10 verdünnt in PBS-A, 20 min
- 1. Antikörper: Kaninchen-Immunglobulin gegen humanes GFAP, bovines S-100, NSE und Fibronektin (alle Dakopatts, Hamburg), jeweils 1:300 verdünnt in PBS-A/ 5% FKS, 60 min
- Waschen in PBS-A
- 2. Antikörper: Schwein-anti-Kaninchen-Immunglobulin (Dakopatts), 1:50 verdünnt in PBS-A, 60 min
- Waschen in PBS-A
- 3. Antikörper: Kaninchen-Peroxidase-anti-Peroxidase-Komplex (Dakopatts) 1:200 verdünnt in PBS-A, 60 min
- Waschen in PBS-A

- Sichtbarmachen der Reaktion durch Substrat nach Nexø (1977): 20 mg 3-amino-9-äthyl-Carbazol (Sigma, Deisenhofen) gelöst in 5 ml NN'-Dimethylformamid (DMFA, Merck, Darmstadt), in 95 ml Acetatpuffer, pH 5, filtriert und mit 50 µl 30%iger H_2O_2 -Lösung versetzt. Einwirkungsdauer 10 min.
- Stop der Reaktion mit Aqua dest.
- Gegenfärbung mit Meyer's Hämalaun, 3 min
- Eindeckeln mit Kaiser's Glycerin-Gelatine.

1.2.1.3. Elektronenmikroskopie

Für die elektronenmikroskopische Untersuchung wurde Tumorgewebe 2 Stunden in gepuffertem 6,25%igen Glutaraldehyd fixiert, in Sörensen-Puffer, pH 7,4, gewaschen und 2 Stunden in 1%igem Osmiumtetroxid nachfixiert. Anschließend wurden die Blöckchen in Aceton dehydriert und in Epon^R eingebettet. Die Ultradünnschnitte wurden mit Bleicitrat und Uranylacetat kontrastiert und in einem Zeiss EM-10 Transmissionselektronenmikroskop bei 60 KV ausgewertet.

1.2.2. Zellkulturen

1.2.2.1. Kultivation

Aus beiden Gehirntumoren N 166/77 und N 422/83 wurden die permanenten Gliomzelllinien 77DG-G-166 (Jahr 1977, DOG, Gliom, lfd. Nr. 166) und 83DG-G-422 durch Explantation von frischem Tumorgewebe in vitro etabliert. Die Zellen wurden in 50- und 260 ml-Plastikflaschen (Nunc^R, 1-53732, Roskilde, Dänemark) sowie in großvolumigen,

silikonisierten Glasflaschen (1l) kultiviert; als Nährmedium diente Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, 074-2100, Paisley, Schottland), dem 10% fetales Kälberserum (FKS, Flow lab., 29-101-54, Meckenheim), sowie pro Liter 100.000 I.E. Penicillin G, 0,1g Streptomycin und als Puffer 10 ml 8,8%ige NaHCO_3 zugesetzt wurden. Die Zellen wurden bei 37°C im geschlossenen System bebrütet und 2-3 mal in der Woche im Verhältnis 1:10 bis 1:20 unter Verwendung einer Trypsinlösung (STV; 100 ml Saline 10fach, 25 ml 25%ige Trypsinlösung, 50 ml 0,1%ige Versene-Lösung, Aqua bidest. ad 1000 ml) gesplittet.

1.2.2.2. Behandlung mit DB-cAMP

Durch eine Behandlung mit N^6 -2'-O-Dibutyryl-Adenosin-3'5'-Monophosphat (DB-cAMP, MacIntyre et al., 1972) wurde die in vitro Differenzierung der Gliomzellen beeinflusst. Hierzu wurden die Zellen in einer 1 mM Lösung von DB-cAMP/Kulturmedium bebrütet und nach 12, 24 bzw. 48 Stunden in 0,5%igem Glutaraldehyd/PBS-A 20 min fixiert, mit Meyer's Hämalaun 3 min gefärbt und lichtmikroskopisch untersucht.

1.2.2.3. Immunochemische Untersuchung

Beide Gliomzelllinien wurden auf Expression der spezifischen Markersubstanzen GFAP, S-100, NSE und Fibronektin untersucht. Die Zellen wurden 20 min in 0,5%igem Glutaraldehyd/PBS-A fixiert, in PBS-A gewaschen und 20 min mit 10%igem normalen Schweineserum präinkubiert. Die PAP-Färbung verlief analog zur Färbung der Tumorschnitte, jedoch mit 40-minütiger Inkubation der Antiseren.

1.2.2.4. Nachweis und Elimination von Mycoplasmen

Mit Hilfe der Fluoreszenz wurde nachgewiesen, daß beide Gliomzellkulturen mit Mycoplasmen kontaminiert waren. Da Mycoplasmen sich störend bei der Auswertung elektronenmikroskopischer Proben auswirken und zudem durch Kreuzreaktionen mit Antikörpern falsch positive Resultate von immunochemischen Färbungen bewirken können, wurden die Zellkulturen über einen Zeitraum von 6 Wochen antibiotisch behandelt. Hierzu wurden dem Kulturmedium alternierend 4 Tage lang 10 mg Tiamulin/l und 3 Tage lang 5 mg Minocyclin/l zugesetzt (Schmid und Erfle, 1984). Zur Kontrolle des Behandlungserfolges wurden die Zellen 10 min mit Methanol/Eisessig, 3:1, fixiert, 10 min mit einer Lösung von 5 mg Bisbenzimidazol/l PBS-A (Sebio, 2000, Walchsing) inkubiert und die Färbung im Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) unter Verwendung eines G 405 nm-Erregerfilters und eines LP 495 nm-Sperrfilters ausgewertet. Bisbenzimidazol bindet selektiv an Adenosin-Thymidin-Bindungen und führt unter den angegebenen Bedingungen zu einer spezifischen Fluoreszenz von DNA.

1.2.3. Transplantationstumoren

Aus beiden Zelllinien 77DG-G-166 und 83DG-G-422 wurden Transplantationstumoren in BALB/c-nu/nu-Mäusen erzeugt. Hierzu wurden subkonfluent gewachsene Tumorzellen mittels STV-Lösung vom Boden des Kulturgefäßes gelöst und im elektronischen Zählgerät (Coulter Electronics LTD, Harpenden, England) gezählt. Jeweils 2×10^6 Zellen wurden in 0,5 ml Medium suspendiert und den Mäusen subkutan im Nackenbereich injiziert. Nach durchschnittlich 2-3 Wochen entwickelten sich etwa bohngroße Tumoren,

die nach Euthanasie der Tiere entnommen und für immun-histochemische Untersuchungen fixiert oder tiefgefroren wurden. Für die histologische und immunochemische Untersuchung auf Expression von GFAP, S-100, NSE und Fibronektin wurden Teile in 6%igem neutralem Formalin fixiert und in Paraplast^R eingebettet; für die elektronenmikroskopische Untersuchung wurden 1 mm³ große Blöckchen in gepuffertem, 6,25%igen Glutaraldehyd fixiert, in Aceton dehydriert und in Epon^R eingebettet. Die restlichen Teile wurden für immunochemische Untersuchungen mit monoklonalen Antikörpern bei -20°C eingefroren.

1.3. Produktion und Charakterisierung monoklonaler Antikörper

1.3.1. Immunisierung

6 Wochen alte, weibliche BALB/c-Mäuse wurden mit Zellen der Gliomlinien 77DG-G-166 und 83DG-G-422 immunisiert. Zur Grundimmunisierung wurden den Tieren jeweils 1×10^6 mit 2,4,6-Trinitrobenzensulfonsäure (TNBS, Sigma, Deisenhofen) modifizierte Zellen (Lemonnier et al., 1977; Stavrou et al., 1981) intraperitoneal injiziert. Eine zweite Immunisierung erfolgte nach 2 Wochen mit jeweils $0,5 \times 10^6$ TNBS-modifizierten Zellen. Nach einer Ruhezeit von 3 Monaten wurden die Tiere mit jeweils 2×10^6 unbehandelten Zellen geboostert. 4 Tage darauf wurde ein Tier durch Genickdislokation getötet und die Milz unter sterilen Kautelen für die Fusion entnommen.

1.3.2. Zellfusionen

Die Fusionen wurden in Anlehnung an die Arbeiten von Davidson et al. (1976), Galfré et al. (1977) und Fazekas de St.Groth et al. (1980) durchgeführt. Als Fusionspartner diente die nicht-produzierende BALB/c-Mäusemyelomzelllinie X63-Ag8.653 (Kearney et al., 1979). 2×10^7 Myelomzellen, die sich zum Zeitpunkt der Fusion in der logarithmischen Wachstumsphase befanden, wurden zusammen mit 2×10^8 Milzzellen in 20 ml serumfreiem DMEM-Medium mit Zusatz von 0,07 ml 1%iger Na-EDTA-Lösung suspendiert und 5 min bei 800 rpm zentrifugiert. Das so entstandene Zellpellet wurde trockengesaugt und in 1 ml 100%iger Polyäthylenglycollösung (PEG, MG 4000, Merck, Darmstadt, 9727), pH 8,4, resuspendiert. Nach Ablauf einer Minute wurden der Suspension über einen Zeitraum von 5 min 3 ml serumfreies Fusionsmedium zugegeben, das aus 97,45 ml Grundmedium (450 ml DMEM, 50 ml Gibco NCTC 135, 5 ml Aminopterin), 2,2 ml Na-Pyruvat (Gibco 043-1360) und 0,35 ml 1%iger Na-EDTA-Lösung bestand; anschließend wurden während weiterer 5 min 4 ml Fusionsmedium mit 20% FKS zugegeben. Nachdem die PEG-Lösung auf diese Weise unter sukzessiver Verdünnung insgesamt 11 Minuten eingewirkt hatte, wurden die Zellen erneut zentrifugiert und in 10 ml DMEM/Na-EDTA/20% FKS resuspendiert. Anschließend erfolgte eine 60-minütige Inkubation bei 37°C und 5% CO₂. Nach dieser Stabilisationszeit wurden die Zellen in 200 ml HAT-Selektionsmedium (Littlefield, 1964), bestehend aus DMEM-Medium mit 20% FKS, das pro Liter 10 ml 8,8%ige NaHCO₃-Lösung, 10 ml 10 mM Hypoxantin-, 10 ml 0,04 mM Aminopterinlösung (Sigma), 1,6 mM Thymidinlösung (Sigma), 100.000 I.E. Penicillin G, 0,1 g Streptomycin und 0,1 g Neomycin enthielt, aufgenommen und auf vier 24-Loch Linbroplatten (Flow Lab., 76-033-05) ausgesät.

Die Platten waren am Tage zuvor durch Aussaat von 1×10^5 Mäuseperitonealzellen pro Vertiefung als "feeder-layer" (Hengartner et al., 1978) vorbereitet worden. Eine HAT-Kontrollreihe mit unfusionierten Myelomzellen wurde angelegt. Die Platten wurden bei 37°C unter Zusatz von $5\% \text{CO}_2$ bebrütet, das HAT-Medium alle 3 Tage ausgetauscht. Nach 6 Tagen war deutliches Koloniewachstum zu erkennen. Nach 10 Tagen waren die Myelomzellen der Kontrollreihe zugrunde gegangen, das HAT-Medium wurde nun zunächst durch HT-Medium (wie HAT-Medium, jedoch ohne Aminopterin) und zwei Tage später durch HCM-Medium ersetzt. Dieses besteht aus 700 ml DMEM (Gibco, 041-1965), 100 ml NCTC-135-Medium (Gibco, 041-1350) und 200 ml FKS, das zuvor 30 min bei 56°C inaktiviert wurde; zugesetzt werden pro Liter 3,7 g NaHCO_3 , 5 ml MEM Na-Pyruvat (Gibco, 043-1360), 100.000 I.E. Penicillin G, 0,1 g Streptomycin und 0,1 g Neomycin. Die Hybridomzellen wurden durchschnittlich alle 3 Tage auf neue, mit feeder-layer versehene Linbroplatten umgesetzt.

1.3.3. Nachweis gliombindender Antikörper

Am 17. Tag nach der Fusion waren die Hybridom-Kolonien soweit ausgebildet, daß die Kulturüberstände auf ihren Gehalt an Antikörpern getestet werden konnten. Hierzu wurden parallel zwei Verfahren verwendet:

1.3.3.1. Micro-ELISA

Die quantitative Bestimmung der Antikörperreaktivität erfolgte modifiziert nach Angaben von Posner et al. (1982). Gliomzellen wurden durch Trypsinierung aus dem Kulturgefäß gelöst und in DMEM/10% FKS in einer Dichte von 1×10^4 Zellen/Vertiefung auf 96-Mikrotiterplatten (Flow Lab, 72-176-05) ausgesät. Nach Ausbildung eines subkonfluenten Monolayers wurden die Zellen mit PBS-A gewaschen und in 0,5%iger Glutaraldehyd/PBS-A-Lösung 20 Minuten fixiert. Nach Auswaschen des Fixatives erfolgte zur Reduzierung unspezifischer Antikörperbindungen eine 30-minütige Inkubation in 10% Schweine-Normalserum/PBS-A. Anschließend wurden die Zellen einmal kurz in PBS-A gewaschen und pro Vertiefung 50 µl unverdünnter Hybridomüberstand als 1. Antikörper zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurden die Platten 3 mal mit PBS-A und 3 mal mit PBS-A/5% FKS gewaschen. Als 2. Antikörper diente mit Meerrettichperoxidase gekoppeltes Kaninchen-Ig-anti-Maus-Ig (Dakopatts) in einer Verdünnung von 1:100 in PBS-A/2% FKS; 50 µl dieser Lösung wurden ebenfalls 30 min inkubiert. Nach 5-maligem Waschen mit PBS-A wurden in jede Vertiefung 100 µl eines Substrates pipettiert, das aus 1 mg ortho-Phenylendiamin (Sigma) pro ml 0,1 M Citratpuffer, pH 4,5, bestand und das vor Gebrauch mit 4 µl/ml einer 3%igen H_2O_2 -Lösung versetzt wurde. Die Farbreaktion wurde nach

10 min im Photometer (Titertek Multiscan^R, Flow Lab.) bei 492 nm ausgewertet. Als positiv wurden Überstände angesehen, wenn sie eine Extinktion von mindestens 0,100 erreichten. Als Leerwert dienten Zellen, die nur mit Substrat versetzt worden waren; als negative Kontrolle diente X63-Ag8.653-Myelomzellüberstand, als positive Kontrolle 1:100 verdünntes Serum einer mit TNBS-modifizierten Gliomzellen immunisierten Maus.

1.3.3.2. Indirekte Immunperoxidasefärbung (IPF)

Als weiterer Nachweis einer Antigen-Antikörperreaktion wurde die indirekte Immunperoxidasefärbung nach Pateraki et al. (1981) verwendet. Hierzu wurden Gliomzellen in DMEM/10% FKS in einer Dichte von 500-1000 Zellen/Vertiefung auf Terasaki-Platten (Nunc^R, 1-63118) ausgesät, 24 Std bebrütet, in PBS-A gewaschen und in 0,5% Glutaraldehyd/PBS-A 20 min fixiert. Nach erneuter Waschung folgte eine 10-minütige Präinkubation mit 20% Schweine-Normalserum in PBS-A. Als 1. Antikörper wurden 20 µl unverdünnten Kulturüberstandes 60 min bei 37°C inkubiert, anschließend wurde 3 mal mit PBS-A/5% FKS gewaschen. Der 2. Antikörper, mit Meerrettichperoxidase konjugiertes Kaninchen-Ig-anti-Maus-Ig, wurde in einer Verdünnung von 1:100 in PBS-A/5% FKS ebenfalls 60 min bei 37°C inkubiert. Dann wurde erneut 3 mal gewaschen und die Reaktion mit Substrat nach Nexø sichtbar gemacht: 20 mg 3-amino-9-äthyl-Carbazol wurden in 5 ml NN'-Dimethylformamid gelöst, in 95 ml 50 mM Acetatpuffer, pH 5, aufgenommen, filtriert und vor Gebrauch mit 50 µl 30%iger H₂O₂-Lösung versetzt. Nach 10-minütiger Einwirkung war im positiven Fall eine deutliche Rotfärbung einzelner oder aller Zellen einer Vertiefung zu erkennen. Bei der Auswertung im Durchlicht-Mikroskop

wurden 4 Intensitätsgrade unterschieden: stark positive (+++), positive (++), schwach positive (+) und negative (-) Reaktionen. Als positive Kontrolle diente Serum einer mit TNBS-modifizierten Gliomzellen immunisierten Maus, als negative Kontrolle unspezifisches Maus-Immunglobulin 1:100 verdünnt.

1.3.4. Klonierung von Hybridomen

Nach dem "screening" (engl.: Prüfen) hinsichtlich Produktion wurden positive Hybridome in HCM suspendiert und in einer Dichte von etwa 500 Zellen/Vertiefung in die erste Reihe einer (96)-Mikrotiterplatte ausgesät. Nun wurde eine Verdünnungsreihe derart angelegt, daß sich in Reihe 8 oder 9 der Platte durchschnittlich 0-2 Zellen befanden. Nach Auffüllen mit Medium wurden die Platten etwa eine Woche bebrütet, bis einzelne Klone die gesamte Bodenfläche der Vertiefung ausfüllten. Die Überstände der Vertiefungen mit nur einem Klon wurden im micro-ELISA getestet und nur die Klone mit der stärksten Antikörperproduktion weitergezüchtet. Um eine stabile Antikörperproduktion zu gewährleisten, wurde diese Selektion alle 4-6 Wochen wiederholt.

1.3.5. Konservierung von Hybridomen

Antikörperproduzierende Hybridome wurden in 260 ml-Plastikflaschen vermehrt und nach Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase eingefroren. Hierzu wurden die Zellen suspendiert, bei 800 rpm 10 Minuten lang zentrifugiert und jeweils 10^6 Zellen in 1 ml Einfriermedium resuspendiert, das aus HCM mit 50% FKS und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO, Serva, Heidelberg) bestand. Die

Portionen zu 1 ml wurden 4 Stunden bei 4°C vorgekühlt und dann bei -79°C tiefgefroren (Ashwood-Smith, 1961). Zum Auftauen wurden die Zellen für 3 min in ein 37°C warmes Wasserbad gegeben, bei 800 rpm zentrifugiert, in HCM resuspendiert und auf Linbroplatten verteilt, die am Tage zuvor mit Mäuseperitonealzellen als feeder-layer vorbereitet worden waren.

1.3.6. Verwendung weiterer monoklonaler Antikörper

Neben den durch die beschriebene Fusion erzeugten monoklonalen Antikörpern wurden für die Untersuchungen noch weitere monoklonale Antikörper verwendet. Die Hybridome 5CC3, 6EB4, 10BD3 und 11EC7 entstammen der Fusion von X63-Ag8.653 Myelomzellen und Splenozyten einer mit TNBS-modifizierten 77DG-G-166 - Gliomzellen immunisierten Maus.

1.3.7. Antikörperselektion

Die Antikörper aller produzierenden Klone sowie die zusätzlich verwendeten Antikörper wurden mittels der indirekten Immunperoxidasefärbung gleichzeitig gegen die Tumorzelllinien 83DG-G-422 und 77-DG-G-166 und gegen verschiedene normale Hundezellen getestet. Hierzu wurden Gehirnzellen, Nierenzellen sowie Fibroblasten neonataler Boxer- und Dalmatinerhundewelpen auf Terasakiplatten ausgesät, bei 37°C bebrütet und nach 48 Stunden mit 0,5%iger Glutaraldehyd/PBS-A-Lösung 20 min fixiert und mit PBS-A gewaschen. Die indirekte Immunperoxidasefärbung wurde wie unter 1.3.3.2. beschrieben durchgeführt. Alle Klone, deren Antikörper sowohl mit

normalen Gehirn- und Nierenzellen als auch mit Fibroblasten reagierten, wurden eingefroren. Weitergezüchtet wurden die Klone, deren Antikörper deutlich mit den Tumorzellen reagierten bei gleichzeitig fehlender oder nur schwacher Reaktion mit normalen Hundezellen.

1.3.8. Untersuchung von Kreuzreaktionen

Um das Reaktionsspektrum der selektierten MAK zu ermitteln, wurden diese mittels der indirekten Immunperoxidasefärbung gegen Tumorzellen verschiedener Spezies getestet. Als Zielzellen dienten kultivierte Zellen der Tumoren N 423/85 und N 478/85 (zwei Meningiome, Hund), und die permanenten Tumorzelllinien 85DG-M-2635 (malignes Melanom, Hund), 85H-M-2013 (malignes Melanom, Mensch), B-16 (Melanom, Maus), 85MP-M-1191 und MP-M (Melanome, Mini-Pig) sowie 79FR-G-41 (experimentelles Gliom, Fischer-Ratte) (Stavrou et al., 1982). Als Kontrolle dienten die zur Immunisierung verwendeten Gliomzellen.

1.3.9. Anreicherung von Immunglobulinen durch Ammoniumsulfatpräzipitation aus serumfreien Hybridomüberständen

Zur Gewinnung von serumfreien Hybridomüberständen wurde das HCM-Medium aus etwa zu 80% dichtgewachsenen Linbro-Vertiefungen abgesaugt und durch serumfreies Hybridomerhaltungsmedium (FEB 100 Medium, Seromed, F 8015) ersetzt. In diesem Medium überlebten die Hybridome bei erhaltener Antikörperproduktion noch etwa 4-5 Tage. Dann wurden die Überstände abgesaugt, zentrifugiert und unter ständiger Bewegung zu gleichen Teilen mit einer

gesättigten Ammoniumsulfatlösung ($1000 \text{ g } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ad 1000 ml aqua dest., mit 30%iger NaOH auf pH 7,0 eingestellt) versetzt und eine Stunde inkubiert (Jonak, 1980). Danach wurde die Flüssigkeit bei 48000 g und 4°C 30 min zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Präzipitat in einer kleinen Menge PBS-A resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension in Dialyseschläuche überführt und gegen PBS-A, pH 7,3, so lange dialysiert, bis das Außendialysat frei von SO_4^{--} -Ionen war. Auf diese Weise wurden die Überstände auf etwa das 10-fache konzentriert.

1.3.10 Bestimmung der Immunglobulinisotypen und -subklassen

$20 \mu\text{l}$ der zehnfach konzentrierten Hybridomüberstände wurden in das zentrale Loch einer Immundiffusionsplatte (Miles-Yeda, Rehovoth, Israel) gegeben. Die peripheren Löcher wurden mit Kaninchen-anti-Maus-IgG, -IgM, -IgG1, -IgG2a und -IgG2b (Miles-Yeda) beschickt (nach Ouchterlony, 1962). Die Vertiefungen wurden mehrmals nachgefüllt. Nach 48 Stunden waren deutliche Präzipitationslinien zu erkennen.

1.3.11. Fixierung der Zielzellen

Um die Stabilität der Antigene gegenüber verschiedenen Fixativen zu testen, wurden die Zielzellen der Linien 77DG-G-166 und 83DG-G-422 über einen Zeitraum von 3 Stunden folgenden Fixativen ausgesetzt: 0,5% Glutaraldehyd/PBS-A, 6% Glutaraldehyd/PBS-A, 2% Paraformaldehyd/2% Glutaraldehyd/PBS-A, 4% Paraformaldehyd/1% Glutaraldehyd/PBS-A, Fixativ nach Bouin (150 ml gesättigte

Pikrinsäurelösung, 50 ml Formalin, 10 ml Eisessig) und Fixativ nach Zamboni (7,5 ml Aqua dest., 10 ml 20%ige Formaldehydlösung, 7,5 ml Pikrinsäure, 75 ml 0,5 M Phosphatpuffer, pH 7,3). Nach anschließendem Waschen in PBS-A wurde die Reaktion mit MAK durch eine indirekte Immunperoxidasefärbung ausgewertet.

1.4. Lichtmikroskopische Darstellung der Antikörperbindung

1.4.1. Zellkulturen

Die Darstellung der Antikörperbindung an Tumorzellkulturen erfolgte durch die indirekte Immunperoxidasefärbung. Hierzu wurden die Zellen in einer Dichte von 1000 bis 2000/ml DMEM-Medium auf 8-fach gekammerte Objektträger (Lab Tek^R, Miles, Naperville USA) verbracht, 24 Stunden bei 37°C bebrütet und mit 0,5%iger Glutaraldehyd/PBS-A-Lösung 20 min fixiert. Danach wurden die Zellen dreimal in PBS-A gewaschen und 30 min in 20% Kaninchen-Normalserum/PBS-A inkubiert. Als erster Antikörper wurden unverdünnte Hybridomüberstände verwendet. Von diesen wurden jeweils 200 µl in eine der 8 Kammern gegeben und 60 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Objektträgeraufsätze entfernt und die Färbung wie unter 1.3.3.2. angegeben vollendet. Die Auswertung und Dokumentation erfolgte an einem inversen Kameramikroskop (Zeiss ICM 405 bzw. IM 35) mit Phasen- und Interferenzkontrasteinrichtung.

1.4.2. Gewebeschnitte

Zur Darstellung der Antikörperreaktion an Paraffinschnitten wurden sowohl die PAP-Technik (Sternberger, 1969) als auch die Avidin-Biotin-Methode (Hsu et al., 1981) verwendet. Die Schnitte wurden auf 50°C erwärmt, in Xylol 15 min entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Bei den anschließenden Färbungen wurden alle Antikörper mit PBS-A/5% FKS verdünnt, und die Schnitte bei Raumtemperatur inkubiert. Nach jeder Inkubation wurde 3 mal 10 min mit PBS-A gewaschen, nicht jedoch nach der Präinkubation mit Normalserum.

Die PAP-Färbung wurde in folgender Reihenfolge durchgeführt:

- 1% H_2O_2 /Methanol, 10 min bei Raumtemperatur (RT) zur Blockade der endogenen Peroxidase
- Kaninchen-Normalserum 1:10, 30 min, RT
- 10fach konzentrierte Hybridomüberstände, 1:100, 2 Std, RT
- Kaninchen-anti-Maus-Immunglobulin (Dakopatts), 1:50, 2 Std, RT
- monoklonaler Maus-PAP-Komplex (Dakopatts), 1:100, 2 Std, RT
- Substrat nach Nexø (3-amino-9-äthyl-Carbazol) 15 min bei RT
- Stop der Reaktion in Aqua dest.
- Kerngegenfärbung mit Meyer's Hämalaun (Merck), 3 min, RT

Die Avidin-Biotin-Färbung wurde unter Verwendung eines Testkits (Vectastain ABC-Kit, Vector Lab. Inc., Burlingame, GB, SK 5100) nach folgendem Schema durchgeführt:

- Pferde-Normalserum 1:100, 30 min, RT
- 10fach konzentrierte Hybridomüberstände 1:100, 60 min, RT
- biotinyliertes Pferde-anti-Maus-Ig, 30 min, RT
- Phosphatase-konjugierter Avidin-Biotin-Komplex, 30 min, RT
- Substrat für alkalische Phosphatase, 20 min, RT
- Stop der Reaktion in Aqua dest.
- Kerngegenfärbung mit Meyer's Hämalaun, 3 min, RT

Als positive Kontrolle bei beiden Färbungen diente 1:100 verdünntes Serum von gegen Gliomzellen immunisierten BALB/c-Mäusen, als negative Kontrolle 1:100 verdünntes, unspezifisches Maus-Immunglobulin. Nach Abschluß der Färbungen wurden die Schnitte unter Verwendung von Kaiser's Glyceringelatine mit Deckgläsern versehen und die Färbung im Lichtmikroskop ausgewertet.

1.5. Elektronenmikroskopische Darstellung der Antikörperbindung

1.5.1. Preembedding-Verfahren

Die immunochemische Färbung vor der Einbettung des Tumormaterials erfolgte sowohl an kultivierten Gliomzellen als auch an 30 µm dicken Kryostatschnitten von Transplantationstumoren.

1.5.1.1. Tumorzellen

Zellkulturen wurden durch die indirekte Immunperoxidase-methode gefärbt, wobei als Substrat 3,3'-Diaminobenzidin (Serva) nach Angaben von Graham und Karnovsky (1966) verwendet wurde. Jeweils 5×10^6 Tumorzellen wurden durch Trypsinierung aus dem Kulturgefäß gelöst, in Reagenzgläsern 30 min mit 0,5% Glutaraldehyd/PBS-A fixiert und 3 mal in PBS-A gewaschen. Danach wurden die Zellen in Suspension mit dem MAK inkubiert und bei 1000 rpm zentrifugiert. Die IPF wurde wie unter 1.3.3.2. angegeben durchgeführt; als Substrat diente eine Lösung von 0,06% DAB in 0,05 M Tris-Puffer, pH 7,6, mit Zusatz von 0,01% H_2O_2 , die vor Gebrauch filtriert wurde und 10 min einwirkte. Durch Waschen der Zellen in PBS-A wurde die Reaktion gestoppt. Anschließend wurde durch 15-minütige Zentrifugation bei 1000 g ein festes Zellpellet hergestellt, das in einer 2%igen Osmiumtetroxid/ Sörensenpuffer-Lösung, pH 7,6, 20 min nachfixiert wurde. Danach wurde das Pellet in einer aufsteigenden Acetonreihe dehydriert und in Epon^R eingebettet. 70 bis 120 nm dicke Ultradünnschnitte wurden angefertigt und bei 60 KV in einem Zeiss EM 10 - Transmissionselektronenmikroskop ausgewertet.

1.5.1.2. Transplantationstumoren

Von frisch entnommenem Tumorgewebe wurden im Gefrier-mikrotom (Cryo-Cut, American Optical Corporation) 30 µm dicke Kryostatschnitte angefertigt und unmittelbar nach dem Schneiden in den Vertiefungen einer Linbroplatte aufgenommen. Während der folgenden Schritte verblieben die Schnitte in den Linbro-Vertiefungen, die benötigten Lösungen wurden durch Absaugen ausgetauscht. Die Preembedding-PAP-Färbung wurde modifiziert nach Angaben

von Priestley und Cuello (1983) durchgeführt; alle Antikörper wurden in PBS-A/5% FKS verdünnt:

- Fixation der Schnitte in 4% Paraformaldehyd/
1% Glutaraldehyd/PBS-A, 30 min
- 3 mal waschen in PBS-A
- 0,1% Triton X-100/PBS-A, 60 min, zur Verbesserung
der Penetration (Sternberger, 1979)
- 5% H_2O_2 /Methanol, 10 min, zur Inaktivierung der
endogenen Peroxidase
- Kaninchen-Normalserum, 1:10, 30 min, RT
- 10fach konzentrierte Hybridomüberstände, 1:200,
60 min bei RT und 24 Std bei 4°C
- 4 mal 30 min waschen in PBS-A
- Kaninchen-anti-Maus Immunglobulin (Dako), 1:50,
30 min bei RT und 12 Std bei 4°C
- 4 mal 30 min waschen in PBS-A
- monoklonaler Maus-PAP-Komplex (Dako), 1:200,
4 Std, RT
- 4 mal 30 min waschen in PBS-A
- Substrat: 0,06% DAB/0,05% Tris-HCl-Puffer, pH 7,6,
filtriert, mit 0,01% H_2O_2 versetzt, 20 min, RT
- Beendigung der Reaktion durch waschen in Aqua dest.
- Nachfixierung in 4% OsO_4 /Sörensenpuffer, 30 min
- Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe

Anschließend wurden die Schnitte flach auf Glasobjektträger aufgezogen und in Epon^R eingebettet. Das Kunstharz wurde 48 Stunden bei 60°C gehärtet. Unter dem Lichtmikroskop wurden Areale von 1 mm² Größe ausgewählt und markiert. Durch kurzzeitiges Eintauchen in flüssigen Stickstoff konnte die Eponschicht vom Glas gelöst werden. Die markierten Bereiche wurden ausgeschnitten, auf Epon-Blöckchen aufgeklebt und zum Schneiden zurechtgetrimmt. Zum Auffinden der Schnittebene wurden

zunächst Semidünn- (1 μm), dann Ultradünnschnitte (70 bis 120 nm) angefertigt und im Elektronenmikroskop bei 60 KV ausgewertet.

1.5.2. Postembedding-Verfahren

Von den Gliomzellkulturen 83DG-G-422 und 77DG-G-166 wurden Zellpellets, bestehend aus ca. 5×10^6 Tumorzellen, durch Zentrifugation bei 1000 g hergestellt und in 4% Paraformaldehyd/1% Glutaraldehyd/PBS-A 60 min fixiert. Frisch entnommene Transplantationstumoren wurden im gleichen Fixativ 6 Stunden unter ständiger Bewegung fixiert, in Würfel von 1 mm³ zerkleinert und diese noch einmal 1 Stunde fixiert. Nach Dehydration in einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden beide Proben sowohl in Epon^R als auch in hydrophilem Methacrylat-Kunstharz LR-White (London Resin Company, Woking, GB) eingebettet. Nach der Polymerisation der Harze bei 55°C über 48 Stunden wurden zunächst Semidünn-, dann Ultradünnschnitte angefertigt. Die Semidünnschnitte wurden auf Glasobjektträger, die Ultradünnschnitte auf Nickelnetzchen montiert. Vor der anschließenden PAP-Färbung wurde die Oberfläche der Schnitte mit 5% H₂O₂/PBS-A "angeätzt", um die Antigene für Antikörperlösungen zugänglich zu machen (Moriarty und Halmi, 1972). Die Färbung selbst wurde analog zur Färbung der Kryostatschnitte im Preembedding-Verfahren durchgeführt, es wurden dieselben Antikörperverdünnungen, Inkubationszeiten und Waschlösungen verwendet. Die PAP-Färbung der Ultradünnschnitte erfolgte durch Auflegen der Nickelnetzchen mit der Oberseite nach unten auf einen Tropfen der jeweiligen Lösung, die Semidünnschnitte wurden durch Auftropfen und Abspülen der Lösungen gefärbt.

Als Substrat diente ebenfalls 3,3'-Diaminobenzidin, die Einwirkungszeit betrug 20 min. Nach Abspülen des Substrates wurden die Schnitte 30 min in 2%iger OsO_4 /Sörensenpuffer-Lösung, pH 7,6 nachfixiert und im Exsikkator getrocknet. Die Semidünnschnitte wurden nach Kerngegenfärbung mit Meyer's Hämalaun im Lichtmikroskop, die Ultradünnschnitte ohne Kontrastierung im Zeiss EM 10 bei 60 KV ausgewertet.

2. Ergebnisse

2.1. Tumoren

2.1.1. Tumor N 166/77

Histologisch besteht der Tumor aus kleinen bis mittelgroßen, fortsatzreichen Zellen mit runden bis bohnenförmigen Kernen von mittlerem Chromatingehalt und einem schmalen Zytoplasmasaum; das Heterochromatin der Kerne ist unregelmäßig verteilt und zum Teil verklumpt (Abb. 3a). Im Tumor finden sich keine Nekrosen und nur vereinzelt Mitosefiguren. An der Vaskularisation sind hauptsächlich Kapillaren beteiligt. In dem insgesamt lockeren Gewebe befinden sich vereinzelt Verschleimungszonen sowie häufige Kugelblutungen (Müller, 1978).

Eine mittels der PAP-Technik durchgeführte immunhistochemische Untersuchung der Tumorschnitte ergab einen hohen Gehalt fast aller Tumorzellen an astrozytenspezifischem GFA-Protein sowie an dem Gliaprotein S-100. Untersuchungen auf Expression von Neuronenspezifischer Enolase (NSE) und Fibronektin (FN) verliefen negativ.

Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung (Müller, 1978) zeigen sich fortsatzreiche Zellen mit runden bis länglichen Kernen, deren Heterochromatin klumpenförmig entlang der Zellmembran angeordnet ist. Im Zytoplasma finden sich zahlreiche Mitochondrien, Polysomen und ein gut entwickeltes raues ER; Gliafilamente liegen z.T. ungeordnet, z.T. gebündelt nebeneinander (Abb. 5a). Die Zellen sind an den Kontaktflächen durch "gap junctions" verbunden (Abb. 5b).

Die Befunde sprechen für das Vorliegen eines weitestgehend differenzierten, kleinzelligen Astrozytoms.

2.1.2. Tumor N 422/83

Histologisch besteht der Tumor aus einem zellreichen, gut vaskularisierten Gewebe mit ausgeprägter, ungeordneter Proliferation perivaskulärer Bindegewebszellen, so daß die gesamte Geschwulst durch Bindegewebszüge gekammert erscheint. Dazwischen befinden sich Areale von dicht beieinander liegenden, zytoplasmaarmen Zellen, die durch kurze Fortsätze unter Bildung optisch leerer Zwischenräume miteinander verbunden sind, so daß hier das Bild eines wabenartigen, feinmaschigen Netzwerkes entsteht. Die Zellkerne sind in der Mehrzahl rund bis oval mit mittlerem Gehalt an randständigem Chromatin und ein bis zwei Nucleoli. Dazwischen liegen vereinzelt Zellen mit kleinen, chromatinreichen Kernen von unregelmäßiger Form. Mitosen sind sehr zahlreich. Im gesamten Tumorgewebe treten zahlreiche eosinophile Verschleimungsfelder auf, um welche die Tumorzellen häufig in palisadenartigen Reihen angeordnet sind. Daneben kommt es häufig zur Bildung von Pseudorosetten in der Umgebung kleinerer Gefäße; Nekrosen fehlen fast völlig. Der Tumor ist zum größten Teil durch eine geschlossene Lage flacher Zellen mit länglichen Kernen gegen das umliegende Hirngewebe abgegrenzt; an mehreren Stellen fehlt jedoch diese Begrenzung, so daß hier das Bild eines infiltrativen Wachstums unter Auflockerung des umliegenden Neuropils entsteht.

Eine immunochemische Färbung der Tumorschnitte ergab kein Vorkommen von Protein S-100, NSE und Fibronektin; GFAP konnte in einigen langgestreckten Zellfortsätzen der Tumorperipherie nachgewiesen werden. Bei diesen Zellen dürfte es sich um reaktive Astrozyten im Sinne einer Randgliose handeln (Abb. 4a). Die Ultrastruktur des Tumors wird im Abschnitt Transplantationstumoren beschrieben.

Zytomorphologie und Tumorarchitektonik sprechen zusammen mit der charakteristischen Lage der Geschwulst für das Vorliegen eines anaplastischen Oligodendroglioms Grad III bis IV.

2.2. Zellkulturen

Die Gliomzellkultur 77DG-G-166 zeichnet sich durch eine homogene Zellpopulation mit hoher Proliferationsgeschwindigkeit aus. Der Zellrasen besteht aus langgestreckten, spindelförmigen Zellen mit zwei oder mehr Fortsätzen und einem zentral gelegenen, runden Kern. Die Zellen sind unter Freilassung von Zwischenräumen überwiegend parallel zueinander angeordnet. Die für Gliazellen typische Ausbildung langer Zellfortsätze bleibt während der Langzeit-Kultivation weitgehend erhalten. Die durch eine immunochemische PAP-Färbung nachgewiesene Expression von GFAP und Protein S-100 wird von den Zellen ebenfalls über die gesamte Kultivationsdauer beibehalten.

Die Kultur 83DG-G-422 ist dagegen durch eine heterogene Zellpopulation gekennzeichnet. Neben spindelförmigen Zellen mit langgestreckten Fortsätzen existieren Formen mit nur kurzen, kolbenförmigen Ausläufern, die sich häufig büschelartig aufzweigen; ein Teil der Zellen haftet der Unterlage breiflächig an und bildet keine Fortsätze aus (Abb. 4b). Die immunochemische Untersuchung auf Expression von GFAP, S-100, NSE und Fibronectin verlief negativ.

Mit zunehmender Kultivationsdauer verändert sich das Aussehen der Kulturen dahingehend, daß die gliatypischen Zellfortsätze immer weiter zurückgebildet werden. Nach etwa 20 Passagen wird das Bild durch kleine Zellen mit wenigen kurzen Fortsätzen bestimmt.

Diese Entdifferenzierung ist durch Behandlung mit Dibutyryl-cAMP reversibel. 24 Stunden nach Zugabe einer 1 mM DBcAMP-Lösung war, bei gleichzeitiger Abnahme der Proliferationsgeschwindigkeit, eine deutliche Ausbildung von Zellfortsätzen zu beobachten (Abb. 3b).

Bei beiden Gliomzellkulturen wurde eine Infektion mit Mycoplasmen nachgewiesen. Die Nachweismethode beruhte auf der spezifischen Fluoreszenz von DNA nach Reaktion mit dem DNA-Fluorochrom Bisbenzimidazol. Nach 3 Wochen alternierender Behandlung mit Tiamulin und Minocyclin waren die Zellkulturen mycoplasmenfrei, die Therapie wurde jedoch noch 3 Wochen darüber hinaus fortgeführt. Bei wiederholten Untersuchungen zeigte sich jedoch, daß ständig Reinfektionen der Kulturen stattfanden. Die Behandlung wurde daher mehrmals wiederholt, mycoplasmenfreie Zellen wurden eingefroren. Eine Resistenzentwicklung der Mycoplasmen gegen die verwendeten Antibiotika wurde nicht beobachtet.

2.3. Transplantationstumoren

Durch subcutane Injektion von jeweils 2×10^6 Gliomzellen der Zelllinien 77DG-G-166 und 83DG-G-422, suspendiert in 0,5 ml Medium, wurden in BALB/c-nu/nu-Mäusen Transplantationstumoren erzeugt, nachfolgend als TT 166/77 und TT 422/83 bezeichnet. Nach durchschnittlich 2 Wochen konnten erbsen- bis bohngroße Tumoren von grauweißer Farbe und fester Konsistenz entnommen werden, die gut gegen das umgebende Unterhautgewebe abgegrenzt waren.

Im histologischen Bild stimmten beide Transplantate hinsichtlich Zytomorphologie und Architektonik weitgehend mit den Primärtumoren überein. Sowohl der kleinzellige, gut differenzierte astrozytäre Charakter des Tumors N 166/77 als auch die Pleomorphie, Mitosenhäufigkeit und der gekammerte Aufbau des Tumors N 422/83 wurden in den Transplantationstumoren wiedergefunden. Bei beiden fehlten jedoch regressive Veränderungen wie Verschleimungszonen und Nekrosen; diese traten erst auf, wenn die Transplantate länger als 2 Wochen in den Tieren belassen wurden.

Eine immunochemische (PAP-)Färbung von Paraffinschnitten der Transplantate ergab ebenfalls eine weitgehende Übereinstimmung mit den Primärtumoren: die Überwiegende Mehrzahl der Zellen von TT 166/77 exprimierten die Gliaproteine S-100 und GFAP; im TT 422/83 konnte weder S-100 noch GFAP nachgewiesen werden. Die Untersuchung auf Expression von NSE und Fibronectin verlief bei beiden Transplantaten, ebenso wie bei den Primärtumoren, negativ.

Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung des Transplantationstumors TT 166/77 zeigt sich eine weitgehende Übereinstimmung mit dem Primärtumor (Müller, 1978; Dahme et al., 1980). Die Zellen liegen ohne erkennbare Interzellulärsubstanz dicht beieinander, an den Kontaktflächen sind vereinzelt "gap-junctions" zu beobachten. Die überwiegend länglichen Zellen besitzen rundliche, zum Teil eingebuchtete Kerne mit unregelmäßig verteiltem, teilweise verklumpten Chromatin. Das Zytoplasma ist reich an Organellen, darunter zahlreiche rundliche Mitochondrien, gut ausgebildete Golgi-Apparate und ein ausgeprägtes rauhes ER. In ausgedehnten, helleren Zytoplasmabereichen finden sich zahlreiche feine Filamente.

Die Zellen des TT 422/83 liegen ebenfalls dicht beisammen und sind durch zahlreiche Membranausstülpungen bzw. Mikrovilli ineinander verzahnt. Speziell ausgebildete Haftstellen sind nur spärlich vorhanden. Die relativ großen Kerne mit 1-2 Nucleoli sind überwiegend stark gelappt, das Heterochromatin ist als schmaler Saum an der Kernwand lokalisiert. Das Zytoplasma ist von geringer Elektronendichte, es enthält zahlreiche Mitochondrien und vereinzelt Autolysosomen. Das rauhe ER ist teilweise zu Kavernen mit elektronendichtem Inhalt erweitert (Abb. 5c). In langgestreckten Zellfortsätzen befinden sich, nahe der Zellmembran, feine Filamente, die parallel zur Hauptachse der Fortsätze verlaufen.

2.4. Produktion und Charakterisierung monoklonaler Antikörper

2.4.1. Hybridome

Insgesamt wurden 3 Fusionen durchgeführt, von denen bei 2 Fusionen kein Hybridomwachstum feststellbar war. Im Folgenden werden die Ergebnisse der dritten, erfolgreichen Fusion näher beschrieben. Detaillierte Angaben zur Fusionstechnik sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Am 14. Tag nach der Fusion war in 72 von 96 mit Zellen beschickten Linbro-Vertiefungen Hybridomwachstum zu erkennen, wobei nicht deutlich zu unterscheiden war, ob das Zellwachstum in einer Vertiefung von einer oder mehreren Hybridzellen ausging. Bezogen auf die Zahl der eingesetzten Myelomzellen (2×10^6) entspricht dies einer Fusionsrate von mindestens 3,6 Hybridomzellen pro 10^6 Myelomzellen.

Die Kulturüberstände der 72 Vertiefungen mit Hybridomwachstum wurden mittels micro-ELISA und IPF auf ihren Gehalt an gliomzell-bindenden Antikörpern getestet. In 46 Überständen (63,8%) wurden Antikörper gegen die Tumorzelllinie N 422/83 nachgewiesen. Die Hybridome dieser Vertiefungen wurden einer ersten Klonierung unterzogen. Mit der beschriebenen Endpunkt-Verdünnungsmethode konnten bereits in der ersten Klonierungsstufe einzelne Klone isoliert werden, indem auf jeder (96)-Klonierungsplatte durchschnittlich 4 bis 5 Vertiefungen mit nur einer Kolonie aufgefunden wurden. Die Überstände dieser Vertiefungen wurden wiederum im ELISA getestet; 123 von 187 insgesamt getesteten Klonen reagierten positiv. Dies entspricht einem Klonierungsergebnis von durchschnittlich 66,9%. Von 8 ursprünglich ELISA-positiven Kolonien konnten keine positiven Klone isoliert werden, diese Zellen hatten die Fähigkeit zur Antikörperproduktion innerhalb von 21 Tagen nach der

Tab. 1: Fusionen

Myelomzelllinie	X63-Ag8.653	2×10^7 Zellen
BALB/c-Maus	Milzzellen	2×10^8 Zellen
Immunogen	83DG-G-422	
Immunisierung	Grundimmun.	1×10^6 TNBS-mod. Zellen i.p.
Tag 15	2. Immun.	$0,5 \times 10^6$ TNBS-mod. Zellen i.p.
Tag 100	Boosterung	2×10^6 native Zellen i.p.
Tag der Fusion	4. Tag nach Boosterung	
Hybridogen	PEG 4000 (Merck),	100 v/v%
Stabilisation	60 min bei 37°C und 5% CO ₂	
Kultivation	In 4 Linbroplatten mit Mäuseperitoneal- zellen als 'feeder-layer', bei 37°C, 5% CO ₂ und in wasserdampfgesättigter Atmosphäre	

Fusion verloren. Bei 6 weiteren, bereits ursprünglich schwach produzierenden Kolonien waren die Antikörpertiter auch nach der ersten Klonierung noch so gering, daß ihre Produktion eingestellt wurde. Aus den verbleibenden 32 Klonierungsplatten wurde der jeweils am stärksten produzierende Subklon abgesaugt und in Linbrovertiefungen mit "feeder-layer" weitergezüchtet.

Nach einer Woche hatten sich die Zellen soweit vermehrt, daß ihre Überstände erneut gegen die Gliomzellen sowie gegen normale Hundezellen getestet werden konnten. Zur Ermittlung von Kreuzreaktionen wurde gleichzeitig auch gegen die Astrozytomlinie 77DG-G-166 getestet. Die gegen diese Zelllinie erzeugten MAK 5CC3, 6EB4, 10BD3 und 11EC7 wurden ebenfalls gegen beide Gliomzelllinien getestet. Die Ergebnisse der indirekten Immunperoxidasefärbung sind in Tab. 2 zusammengefaßt. Insgesamt reagierten 16 MAK nur mit Zellen neuroektodermaler Herkunft, 7 davon reagierten nur mit Gliomzellen, 3 Antikörper reagierten stark mit Gliomzellen und nur schwach mit normalen Hirnzellen. Auffallend war die Häufigkeit der Kreuzreaktionen mit beiden Gliomzelllinien; nur 4 MAK aus der Fusion gegen 83DG-G-422 erkannten die Zellen der Linie 77DG-G-166 nicht, umgekehrt reagierten die 4 MAK aus der Fusion gegen die Zelllinie 77DG-G-166 alle, wenngleich mit herabgesetzter Intensität, mit den Zellen der Linie 83DG-G-422.

Für die weiteren Untersuchungen wurden aus der Fusion 6 stark produzierende Klone gewählt, deren Antikörper nicht oder nur schwach mit normalen Hirnzellen und nicht mit anderen Hundezellen reagierten (in Tab. 2 mit '*' gekennzeichnet); die 4 MAK aus der Fusion gegen die Zelllinie 77DG-G-166 waren schon zuvor aufgrund ihrer Spezifität selektiert worden. Die übrigen Klone und auch Hybridome der weitergeführten Klone wurden eingefroren, auf sie konnte bei Bedarf zurückgegriffen werden.

Tab. 2: Reaktivität monoklonaler Antikörper mit Gliomzellen und mit normalen Hundezellen (Hirnzellen, subependy- males Glialager, Nierenzellen, Fibroblasten); indirekte Immunperoxidasefärbung

Klon	N422/83	N166/77	Hirnz.	SEGL	Nierenz.	Fibrobl.
1EC2	++	+	++	+	+	+
28D3	+	+	+	-	-	-
3HB2	++	+	+	+	+	+
4HE7	+	-	+	-	-	+
5GC3	+	+	++	++	+	++
6HH4	++	+	++	++	-	-
80D1	+	+	+	+	+	-
9EC2	++	++	++	++	++	++
11HC8	+	+	+	+	+	-
12BB2	++	+	+	++	+	+
13BF1	+	+	+	+	-	-
14ED7	+	+	+	+	+	+
15HE2	+	+	+	-	-	-
*17EC5	+++	+++	+	-	-	-
*19FF2	+++	+	-	-	-	-
20AG8	+	-	-	-	+	+
21DF4	++	+	+	+	+	+
*22FF1	+++	+++	-	-	-	-
24CC7	++	+	+	+	-	-
25BH2	+	+	++	++	+	+
26EF3	+	-	+	-	+	+
*27EC1	++	++	-	-	-	-
29CD6	++	+	++	+	+	+
*32DF5	++	++	+	+	-	-
33FE6	+++	++	++	++	-	-
37EG2	+	+	+	+	+	+
38DD3	+	+	+	+	-	+
39FB4	++	++	+	+	+	+
41EG5	+	+	+	+	+	+
43HF1	++	+	+	+	-	+
44AC6	+	-	+	+	+	+
*45H02	+++	+++	+	-	-	-
* 5CC3	+	+++	-	-	-	-
* 6EB4	++	+++	-	-	-	-
*10B03	+	+++	-	-	-	-
*11EC7	+	+++	-	-	-	-

Die ausgewählten Klone wurden im Abstand von 14 Tagen noch 2 mal kloniert, um nichtproduzierende Varianten auszuschließen. Dennoch stellten 2 weitere Klone (19FF2 und 27EC1) bis zum Zeitpunkt der 3. Klonierung (56. Tag nach der Fusion) ihre Antikörperproduktion gänzlich ein. Die Produktion der übrigen Klone blieb über diesen Zeitpunkt hinaus stabil. Für die nachfolgenden immun-histochemischen Färbungen standen somit die monoklonalen Antikörper der Klone 17EC5, 22FF1, 32DF5 und 45HD2, sowie der Klone 5CC3, 6EB4, 10BD3 und 11EC7 zur Verfügung.

2.4.2. Kreuzreaktionen mit Tumorzellen verschiedener Species

Die selektierten MAK wurden mit einer IPF gegen fixierte Zellen aus zwei Hunde-Meningiomen (N 423/85 und N 478/85), einem experimentellen Rattenglom (79FR-G-41) sowie aus Melanomen von Hund (85DG-M-2635), Mensch (85H-M-2013), Maus (B-16) und Mini-Pig (85MP-M-198, 85MP-M-596 und 85MP-M-1191) getestet. Als Vergleichswert dienten Zellen der zur Immunisierung verwendeten Gliomzelllinien.

Bis auf die Zellen des Hunde-Meningioms 423/85, die von keinem der Antikörper erkannt wurden, zeigten alle getesteten Tumorzellen gemeinsame antigene Determinanten mit den Hunde-Gliomzellen. Alle Antikörper färbten außer diesen noch eine oder mehrere andere Tumorzellarten an. Das breiteste Reaktionsspektrum zeigte der MAK 45HD2. (Tab. 3)

Tab. 3: Kreuzreaktionen der einzelnen MAK mit verschiedenen Tumorzelllinien; Indirekte Immunperoxidase-färbung: Bewertung: +++ starke, ++ mittelstarke, + schwache, - keine Reaktion

Zelllinie	17EC5	22FF1	32DF5	45HD2	5CC3	6EB4	10BD3	11EC7
83DG-G-422	+++	++	++	+++	+	++	+	+
77DG-G-166	++	+	+	++	+++	+++	+++	++
N 423/85	-	-	-	-	-	-	-	-
N 478/85	-	-	+	++	-	+	-	-
79FR-G-41	++	-	-	-	++	++	+	+
85DG-M-2635	+	-	++	+	-	+	+	-
85H-M-2013	+	-	++	+	-	+	+	-
B-16	+	-	-	++	-	-	-	-
85MP-M-198	-	+	-	-	-	-	-	-
85MP-M-596	-	-	-	+	-	+	-	-
85MP-M-1191	-	-	++	+++	-	+	-	-

2.4.3. Immunglobulinisotypen und -subklassen

Zehnfach konzentrierte, serumfreie Kulturüberstände wurden im Agargel-Immundiffusionstest gegen Subklassen- und Isotypenantisera aus Kaninchen (Miles) getestet. Sechs monoklonale Antikörper konnten aufgrund der Präzipitationslinien als IgG, zwei Antikörper als IgM identifiziert werden. Die Ergebnisse sind in Tab. 4 zusammengefaßt.

Tab. 4: Immunglobulinklassen von 8 monoklonalen Antikörpern.
Agargel-Immundiffusionstest nach Ouchterlony (1962)

Klon	17EC5	IgG2b	Klon	5CC3	IgG2b
"	22FF1	IgG1	"	6EB4	IgG2b
"	32DF5	IgM	"	10BD3	IgG1
"	45HD2	IgM	"	11EC7	IgG2b

2.4.4. Stabilität der Gliomantigene

Monolayer der Zelllinien 77DG-G-166 und 83DG-G-422 wurden verschiedenen Fixativen ausgesetzt, um die Stabilität der von monoklonalen Antikörpern erkannten Antigene zu testen. Die Fixationsdauer betrug 3 Stunden, dies entspricht der Mindestfixationszeit elektronenmikroskopischer Gewebeproben. Die Restaktivität der Antikörper wurde mittels einer IPF bestimmt (Tab. 5). Als Vergleichswert diente die Fixation in 0,5% Glutaraldehyd/PBS-A. Bei der Fixation nach Bouin konnten 3, nach Zamboni 2, und nach Fixation in 6% Glutaraldehyd ebenfalls 2 MAK nicht mehr nachgewiesen werden. Die geringste Auswirkung auf die Antigenität hatten Gemische

aus Paraformaldehyd und Glutaraldehyd; zur Erzielung einer befriedigenden Ultrastruktur wurden daraufhin für immunelektronenmikroskopische Untersuchungen an Gewebeproben eine Gemisch aus 4% Paraform- und 1% Glutaraldehyd in PBS-A verwendet.

Tab. 4: Indirekte Immunperoxidasefärbung nach 3-stündiger Fixation der Zielzellen* mit verschiedenen Fixativen

	17EC5	22FF1	32DF5	45HD2	5CC3	6EB4	10BD3	11EC7
Glutaraldehyd 0,5%	+++ +++	+++ +++	++ ++	+++ +++	+ +++	++ +++	++ +++	+ +++
Glutaraldehyd 6%	+ +	++ +	- -	+ +	+ ++	+ ++	+ ++	- -
Paraformaldehyd/ Glutaraldehyd 2%/1%	+++ +++	++ ++	++ +	+++ ++	+ +++	++ +++	++ +++	+ ++
Paraformaldehyd/ Glutaraldehyd 4%/1%	++ ++	++ ++	+ +	+++ ++	+ +++	++ +	+ +++	+ ++
Fixativ nach Bouin	- -	+++ ++	- -	+ +	+ +++	- -	++ +++	+ ++
Fixativ nach Zamboni	+++ ++	+ +	- -	- -	+ +++	++ ++	++ +++	+ +++

* Als Zielzellen dienten 83DG-G-422 (oberer Wert) und 77DG-G-166 (unterer Wert)

2.5. Immunochemische Darstellung der Antikörperbindung

2.5.1. Lichtmikroskopie und Preembedding-Verfahren

2.5.1.1. Gliomzellen

Die Bindung der monoklonalen Antikörper an die zur Immunisierung verwendeten Gliomzellen wurde mittels der indirekten Immunperoxidasefärbung sowie der Avidin-Biotin-Technik licht- und elektronenmikroskopisch dargestellt. Für die Lichtmikroskopie wurde als Substrat 3-amino-9-äthyl-Carbazol verwendet, was in einer deutlichen Rotfärbung der Reaktionsstellen resultierte. Bei der Auswertung im Durchlichtmikroskop war ein unterschiedliches Verhalten der MAK festzustellen: während die MAK 5CC3, 6EB4, 10BD3 und 11EC7 die gesamte Oberfläche der 77DG-G-166-Zellen homogen, jedoch in unterschiedlicher Intensität, anfärbten, reagierten die MAK 17EC5, 22FF1, 32DF5 und 45HD2 meist nur mit Teilen der Oberfläche von 83DG-G-422-Gliomzellen; das Reaktionsprodukt war überwiegend in Kernnähe und an Abschnitten von Zellfortsätzen lokalisiert (Abb. 4c,d).

Zur elektronenmikroskopischen Darstellung der Antikörperbindung wurde als Substrat für Peroxidase 3,3'-Diaminobenzidin verwendet, das nach Reaktion mit Osmium elektronendichte Komplexe bildet. Die nach der Kunstharzeinbettung der gefärbten Zellen angefertigten Ultradünnschnitte wurden zunächst ohne Kontrastierung im Elektronenmikroskop ausgewertet. Die Bindungsstellen der MAK konnten aufgrund des elektronendichten Niederschlages von Reaktionsprodukt lokalisiert werden. Die Reaktion aller 8 getesteten MAK blieb auf die äußere Zellmembran der Gliomzellen beschränkt; Unterschiede bestanden nur insoweit, als bei der Färbung mit den Antikörpern 17EC5, 22FF1, 32DF5 und 45HD2 einzelne

Abschnitte der Zelloberfläche frei von Reaktionsprodukt blieben (Abb. 5e), die übrigen Antikörper waren an der gesamten Zellmembran der Gliomzellen lokalisiert (Abb. 5d). Dieser Befund stimmt mit den lichtmikroskopischen Ergebnissen überein. Die Ultrastruktur der Gliomzellen war erst nach Kontrastierung der Ultradünnschnitte mit Bleicitrat und Uranylacetat zu beurteilen; zelltypische Elemente wie Gliafilamente, Mitochondrien, rauhes ER, Pinocytosevesikel und Kernstrukturen waren ausreichend gut zu erkennen, das Reaktionsprodukt konnte auch an kontrastierten Schnitten noch lokalisiert werden.

2.5.1.2. Gewebeschnitte

Die lichtmikroskopische Darstellung der Antikörperbindung an Zellen der Primär- und Transplantationstumoren erfolgte sowohl mittels der PAP-Technik als auch mit der Avidin-Biotin- (ABC-)Methode. Die Reaktion von zwei MAK gegen Tumor Tumor N 422/83 konnte am Paraffinschnitt des Primärtumors nachgewiesen werden: MAK 45HD2 färbte die Mehrzahl der Tumorzellen deutlich an, die stark proliferierten, bindegewebsartigen Zellverbände in Gefäßnähe wurden nur stellenweise angefärbt. Im angrenzenden gesunden Hirngewebe wurden gliale Zellen, allerdings mit geringerer Intensität als die Tumorzellen, angefärbt. Der MAK 22FF1 reagierte mit vereinzelten Zellen im Tumorbereich, das gesunde Hirngewebe blieb ungefärbt. Von den MAK gegen Tumor N 166/77 konnten ebenfalls zwei Antikörper, 11EC7 und 10BD3, am Paraffinschnitt des Primärtumors dargestellt werden (Abb. 3c,d). Beide reagierten mit einem Teil der Tumorzellen, das unveränderte Hirngewebe in der Umgebung des Tumors blieb ungefärbt.

An Paraffinschnitten der Transplantationstumoren konnte die Reaktion von insgesamt 5 MAK dargestellt werden. Neben den Antikörpern 45HD2, 22FF1, 10BD3 und 11EC7, die auch die Primärtumor-Schnitte anfärbten, reagierte auch der MAK 32DF5 deutlich mit den Tumorzellen des Transplantationstumors TT 422/83. Im Gegensatz zu den Primärtumoren wurden fast alle Zellen der Transplantate von den färbenden MAK markiert, auch der Antikörper 22FF1, der nur einzelne Zellen des Primärtumors erkannte, färbte homogen sämtliche Zellen des TT 422/83 an.

Wesentliche Unterschiede in den Ergebnissen der PAP- und der ABC-Färbung bestanden nicht. Mit Letzterer konnten lediglich die Inkubationszeiten um die Hälfte verkürzt werden, ohne daß dabei die Intensität der Reaktion vermindert wurde; dies weist auf eine erhöhte Sensitivität des Avidin-Biotin-Systems gegenüber der PAP-Technik hin. Dennoch konnten die MAK 17EC5, 6EB4 und 5CC3 an Paraffinschnitten auch mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden.

Die elektronenmikroskopische Darstellung der Antikörperbindung an Zellen der Transplantationstumoren erfolgte durch eine PAP-Färbung von 30 µm dicken, fixierten Kryostatschnitten, die zur Verbesserung der Antikörperpenetration mit Triton X-100 vorbehandelt worden waren. Bereits bei der lichtmikroskopischen Vorauswertung der Schnitte konnten alle 8 getesteten MAK an der Zellmembran der Tumorzellen lokalisiert werden. Nach der Anfertigung von Ultradünnschnitten konnte dieser Befund im elektronenmikroskopischen Bild bestätigt werden. Der elektronendichte DAB-Niederschlag beschränkte sich ausschließlich auf die äußere Zellmembran (Abb. 5f), wobei bei einem Teil der Zellen die gesamte Zelloberfläche markiert war, bei anderen Teile der Membran frei von Reaktionsprodukt blieben. Ob dies

auf ein spezifisches Verteilungsmuster von Antigenen oder auf eine nur partielle Penetration von Antikörper-Lösungen zurückzuführen ist, konnte nicht festgestellt werden, da dieses Phänomen bei allen Proben zu beobachten war. Die Ultrastruktur der Tumorzellen war in ausreichendem Maße erhalten, um nach einer nachträglichen Kontrastierung der Schnitte zellspezifische Strukturen zu erkennen.

2.5.2. Postembedding-Verfahren

Gliomzellen und von ihnen stammende Transplantationstumoren wurden in 4% Paraformaldehyd/1% Glutaraldehyd/PBS-A fixiert, in Epon^R bzw. LR-White^R eingebettet und von beiden Proben Ultradünnschnitte angefertigt. Diese wurden mittels der PAP-Technik gefärbt.

Mit dieser Postembedding-Technik konnte keiner der im Preembedding-Verfahren darstellbaren Antikörper lokalisiert werden. Die Färbetechnik wurde daraufhin mehrfach modifiziert: die Inkubationszeiten wurden bis auf 48 Stunden ausgedehnt, die Konzentration des Fixativs bis auf 1% Paraformaldehyd/0,1% Glutaraldehyd verringert; die Oberfläche der Schnitte wurde Lösungen von 10% H₂O₂/Methanol und Natrium-Methylat/Methanol (Sternberger, 1979) ausgesetzt, um die Antigene für die Antikörperlösungen zugänglich zu machen. Dennoch konnte eine spezifische Antikörper-Lokalisation im Postembedding-Verfahren nicht erzielt werden. Es muß daher davon ausgegangen werden, daß die von den verschiedenen MAK erkannten Antigene während der Dehydratation und Einbettung der Proben denaturiert bzw. zerstört wurden.

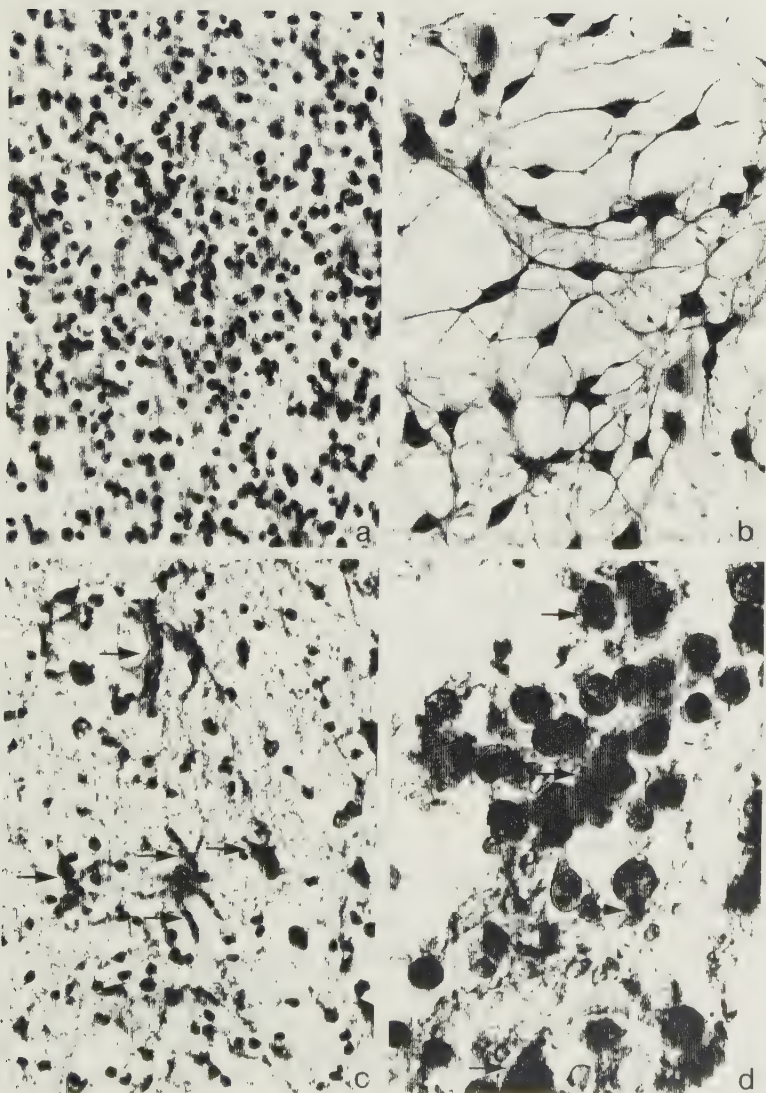


Abb. 3

Abb. 3: Astrozytom N 166/77 und daraus etablierte Zellkultur 77DG-G-166

- a) Primärtumor, Paraffinschnitt: kleinzelliger, gut differenzierter, astrozytärer Aufbau des Tumors. HE-Färbung, x 260.
- b) Zellkultur 77DG-G-166; 10. Passage nach 24-stündiger Behandlung mit DB-cAMP; Ausbildung langgestreckter Zellfortsätze bei schmalem Zytoplasmasaum; HE-Färbung, x 320.
- c), d) Darstellung der Antikörperbindung am Paraffinschnitt des Primärtumors mittels PAP-Technik. Der MAK 11EC7 (c) färbt einzelne astrozytäre Zellen und Fortsätze deutlich an (→). MAK 10BD3 (d) bindet hauptsächlich an die Zelloberfläche des Perikaryon (→). Kerngegenfärbung mit Hämalaun, c x 200, d x 780.

Abb. 4: Tumor N 422/83 und daraus etablierte Zellkultur 83DG-G-422

- a) Paraffinschnitt, Darstellung von GFAP mittels PAP-Technik. Astrozytenfortsätze der Randgliose sind GFAP-positiv (//). Mesenchymale (→) und gliomatöse (⇒) Areale im Tumorbereich. Kerngegenfärbung mit Hämalaun, x 152.
- b) Zellkultur 83DG-G-422, 12. Passage. Flach anhaftende, protoplasmatische Zellformen (↔) neben spindelförmigen Zellen mit langgestreckten Fortsätzen (→). Zahlreiche Mitosen (//). HE, x 420.
- c), d) Indirekte Immunperoxidasefärbung; MAK 17EC5 (c) färbt die gesamte Tumorzellmembran homogen an (→), 45HD2 (d) färbt einzelne Zellen nur partiell (→). Von beiden Antikörpern wird ein Teil der Zellen nicht erkannt. Differential-Interferenzkontrast, x 420.

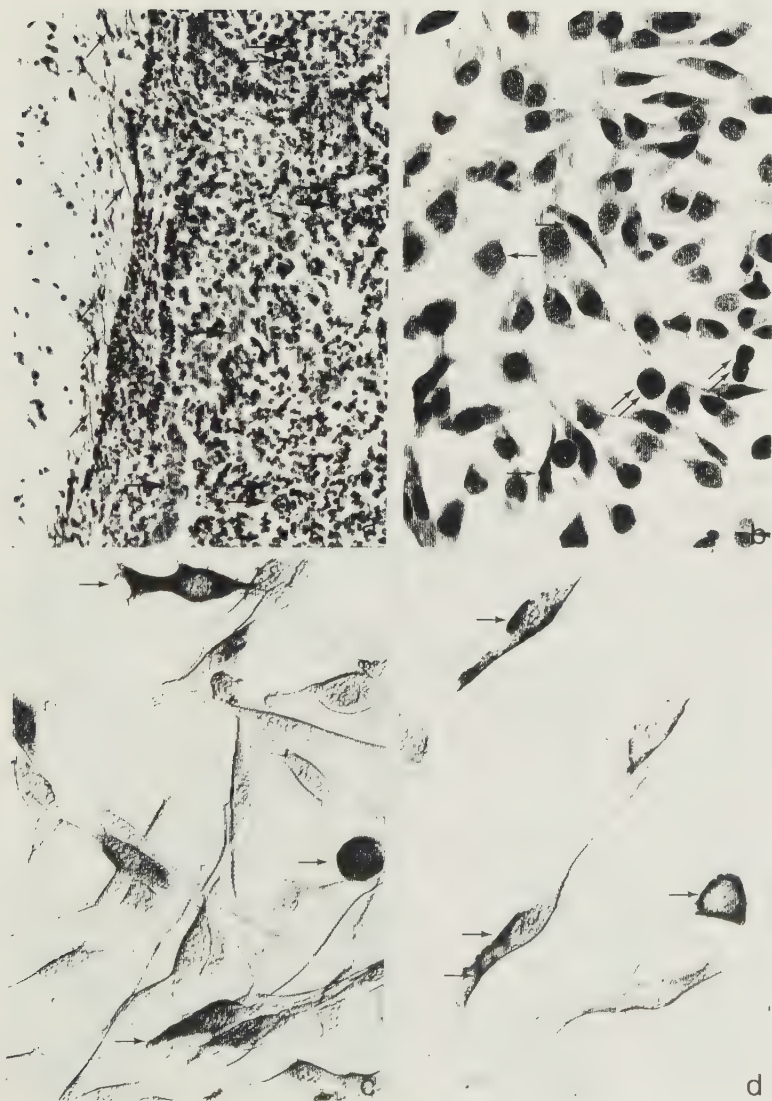


Abb. 4

Abb. 5: Transmissions-Elektronenmikroskopie

- a),b) Primärtumor N 166/77. Areale mit Gliafilamenten (a,→) und einzelne "gap junctions" (b,→), a x 11.250, b x 14.625.
- c) Transplantationstumor TT 422/83. Große Kerne mit schmalen Heterochromatinsäumen, Areale mit Filamenten (→) und erweitertes raues ER (←). x 6.800.
- d-f Immunochemische Darstellung der Antikörperbindung im Preembedding-Verfahren
- d) Astrozytäre Zelle der Linie 77DG-G-166; das Reaktionsprodukt ist an der gesamten Zelloberfläche lokalisiert (→). Indirekte Immunperoxidasefärbung mit MAK 108D3, x 6.300.
- e) Zelle der Kultur 83DG-G-422; unregelmäßige Verteilung des Reaktionsproduktes auf der Zellmembran bei MAK 45HD2 (→), indirekte Immunperoxidasefärbung, x 12.500.
- f) PAP-Färbung am Kryostatschnitt von TT 166/77; DAB-Reaktionsprodukt an den Zellmembranen zweier aneinandergrenzender Tumorzellen (→), x 25.000.

Alle Präparate kontrastiert mit Bleicitrat und Uranylacetat.

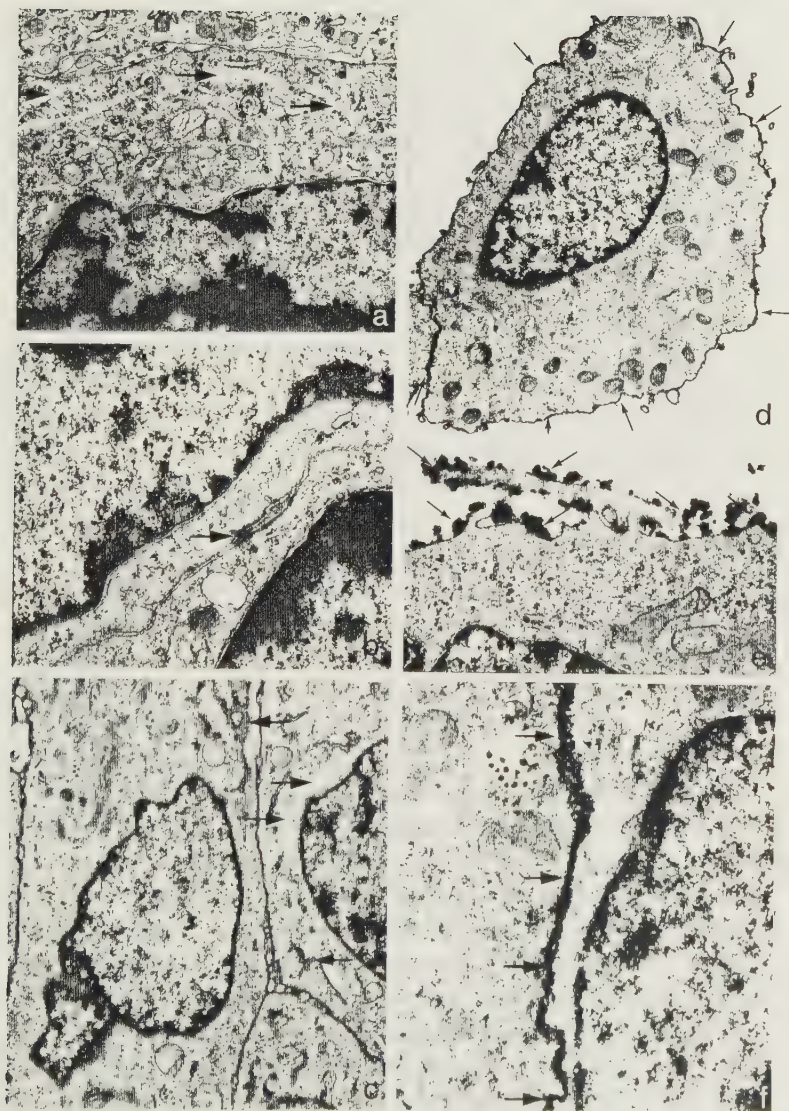


Abb. 5

D. Diskussion

Aus der in dieser Arbeit beschriebenen Fusion zwischen Myelomzellen der Linie X63-Ag8.653 und Milzzellen einer Maus, die mit TNBS-modifizierten Hundegliomzellen der Linie 83DG-G-422 immunisiert worden war, gingen insgesamt 72 Hybridomkolonien hervor, von denen 46 Antikörper gegen das Immunogen produzierten. Dies entspricht, im Vergleich zu Angaben anderer Autoren, die ebenfalls mit Tumorzellen immunisierten (Koprowski et al., 1978; Schnegg et al., 1981a), einer relativ hohen Rate von 63% positiven Kolonien. Der Anteil antikörperproduzierender Klone dürfte in erster Linie von der Art der Immunisierung sowie von den immunogenen Eigenschaften des Antigens abhängen. Mit dem beschriebenen Immunisierungsschema - 2-malige Grundimmunisierung mit niedriger Zellzahlen, 3-monatige Ruhezeit und Boosterung mit erhöhter Antigenmenge - wurde von vorneherein auf die Stimulation einer hohen Zahl antikörperproduzierender B-Lymphozyten abgezielt. Die Modifizierung der Gliomzellen mit TNBS (Lemonnier et al., 1977) dürfte an der gut ausgeprägten Immunreaktion des immunisierten Tieres maßgeblich beteiligt gewesen sein; der positive Effekt der TNBS-Modifikation von Tumorzellen auf die humorale Immunantwort wurde bereits mehrfach bestätigt (Stavrou et al., 1980; Zänker et al., 1981). Ebenso war der hohe Anteil Immunglobulin G produzierender Klone - von acht näher charakterisierten Klonen sezernierten sechs IgG, zwei IgM - aufgrund des Immunisierungsschemas und der Verwendung von Milzzellen zur Fusion zu erwarten (Gerhard et al., 1980). Mehrere Klone stellten ihre Antikörperproduktion kurze Zeit nach der Fusion ein; diese vorwiegend auf Chromosomenverlusten beruhende Instabilität von Hybridomen wurde von anderen Autoren bestätigt (Köhler et al., 1976;

Hengartner et al., 1978; Galfré et al., 1980). Durch mehrfaches Klonieren konnte die Produktion der übrigen Klone über Monate hinweg stabil gehalten werden. Zur Selektion spezifisch mit Gliomzellen reagierender MAK wurden die Überstände aller antikörper-produzierender Kolonien nach der ersten Klonierung immunochemisch gegen normale Hundezellen getestet. Dieses Verfahren ermöglicht den sicheren Ausschluß von Klonen, deren Antikörper auch mit unveränderten Zellen reagieren, erlaubt aber keine sichere Aussage darüber, ob die selektierten MAK ausschließlich Tumorzellen erkennen; hierzu sind weitere, insbesondere immunhistologische Testverfahren erforderlich (Coakham, 1984). Die selektierten Antikörper wurden daher an Gewebeschnitten der Primärtumoren getestet. Von 4 am Paraffinschnitt nachweisbaren Antikörpern reagieren 3 ausschließlich mit Gliomzellen der tumorös veränderten Areale (22FF1, 10BD3, 11EC7), das an den Tumor angrenzende Hirngewebe wurde nicht angefärbt. Der vierte MAK reagierte, allerdings in herabgesetzter Intensität, auch mit normalen Gliazellen. Es wurde daher davon ausgegangen, daß die monoklonalen Antikörper 22FF1, 10BD3 und 11EC7, soweit mit den durchgeführten Tests feststellbar, gliom-assoziierte Antigene erkennen. Ein Teil dieser Antigene wurde auch an Meningiomzellen des Hundes und an Gliom- und Melanomzellen verschiedener Species nachgewiesen. Über Kreuzreaktionen monoklonaler Antikörper mit Gliom- und Melanomzellen wird in zahlreichen Untersuchungen berichtet (Dippold et al., 1980; Liao et al., 1981; Seeger et al., 1981; Cahan et al., 1982; Carrel et al., 1982; 1983; Pukel et al., 1982; Wikstrand et al., 1982; Wikstrand und Bigner, 1982; Saxton et al., 1983;). Ob diese Antigene von Tumoren verschiedener Species exprimiert werden oder ob den Kreuzreaktionen

eine "intrinsic cross reactivity" monoklonaler Antikörper (Milstein et al., 1980) zugrunde liegt, konnte ebenso wie die Frage, ob es sich bei diesen Antigenen um Differenzierungsantigene, die auch von embryonalen Geweben exprimiert werden, oder um ausschließlich von Tumorzellen gebildete Neoantigene handelt, im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Auch die Frage nach dem Charakter der antikörperdefinierten Antigenepitope muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Das Reaktionsspektrum monoklonaler Antikörper gegen TAA wird in hohem Maße auch von der immunologischen Heterogenität bestimmter Tumoren beeinflusst. Die beiden untersuchten Gliome zeigten diesbezüglich ein sehr unterschiedliches Verhalten. Das histologische Bild des Primärtumors N 166/77 ist durch eine einheitliche, gut differenzierte astrozytäre Zellart gekennzeichnet. Die von diesem Tumor abgeleitete Langzeit-Kultur 77DG-G-166 behielt über 90 Passagen hinaus konstante Eigenschaften bei: eine schnell proliferierende, homogene Population spindelförmiger Zellen mit langgestreckten, z.T. sternförmigen Fortsätzen, die die Fähigkeit zur Expression der Gliaproteine S-100 und GFAP während der gesamten Kultivationsdauer nicht verloren.

Im Gegensatz dazu können bei dem Tumor N 422/83 bereits histologisch zwei Zellarten unterschieden werden; zum einen eine gliale Komponente, die selbst wiederum durch eine ausgeprägte Pleomorphie gekennzeichnet ist, zum anderen eine besser differenzierte, von den Gefäßen ausgehende sarkomatöse Komponente. Möglicherweise handelt es sich hier um einen gliös-mesenchymalen Kompositionstumor (Meyer, 1919/20), über deren Vorkommen beim Menschen Rubinstein 1964 berichtet. Immerhin sprechen das morphologische Erscheinungsbild des Tumors und seine Kreuzreaktivität mit anderen neuroektodermalen Tumoren für seine histogenetische Einordnung als

Oligodendrogliom. Welche der beiden Zellarten sich in der Zellkultur 83DG-G-422 wiederfindet, konnte nicht mit Sicherheit bestimmt werden, da spezifische Markerproteine (S-100, GFAP, NSE) von keiner der Zellen exprimiert werden. Es gibt jedoch Hinweise darauf, daß beide Tumorkomponenten in der Langzeitkultur vertreten sind. Zum einen zeigt der aus der Zellkultur abgeleitete Transplantationstumor TT 422/83 histologisch eine weitgehende Übereinstimmung mit dem Primärtumor: lockeres, gliomatöses Gewebe erscheint durch in Zügen angeordnete, sarkomatöse Zellverbände gekammert. Zum anderen treten in der Zellkultur konstant zwei verschiedene Zelltypen auf: neben spindelförmigen Zellen mit teils langgestreckten, teils kolbigen Fortsätzen, existieren flach ausgebreitete, protoplasmatische Zellformen mit nur kurzen Ausläufern. Im Verlauf von etwa 20 Passagen bildeten die Zellen ihre Fortsätze immer weiter zurück, diese Erscheinung war jedoch durch Behandlung der Zellen mit DB-cAMP (MacIntyre et al., 1972) reversibel.

Die weitgehende Homogenität von Tumor N 166/77 wie die Heterogenität von Tumor N 422/83 drücken sich auch im unterschiedlichen Verhalten der gegen sie erzeugten MAK aus. Während die gegen 77DG-G-166 hergestellten MAK die gesamte Oberfläche aller Zellen der Kultur homogen anfärben, reagieren die gegen Tumor N 422/83 produzierten Antikörper mit einzelnen Zellen, darunter besonders flach ausgebreitete, protoplasmatische Formen, nicht; spindelförmige Zellen werden meist ganz, Übergangsformen oft nur partiell angefärbt. Die Frage, ob nicht-reagierende Zellen die entsprechenden Antigene nicht mehr exprimieren, diese Zellen also in vitro eine genetische Transformation erfahren haben, oder ob die Antigene zellzyklusabhängig temporär nicht oder nur partiell exprimiert werden, könnte durch Klonierung

bzw. Synchronisation der Tumorzellpopulation geklärt werden. Wikstrand et al. (1983) untersuchten die Antigen-Heterogenität einer etablierten, humanen Gliomzelllinie, indem sie diese klonierten und 8 Klone mit 10 verschiedenen MAK untersuchten. Der Anteil der von den einzelnen Klonen exprimierten Antigene variierte von 2/10 bis 10/10, eine Abhängigkeit von Karyotyp-Änderungen bestand dabei nicht. Chromosomenverluste im Verlauf der Zellzüchtung wurden jedoch häufig beschrieben (Zur Hausen et al., 1966; Parshad und Sanford, 1968; Freed und Schatz, 1969; Thust, 1971). Die Reaktionsweise des MAK 32DF5, der deutlich mit Zellen des paraffin-eingebetteten Transplantationstumors II 422/83 reagiert, am Paraffinschnitt des Primärtumors jedoch nicht nachweisbar ist, deutet auf eine in vitro-Transformation der Tumorzellen hin. Dagegen dürfte das Nicht-Erkennen von Tumorzellen an Paraffinschnitten der Gehirntumoren durch die MAK 17EC5, 5CC3 und 6EB4 eher auf eine Denaturierung der Antigene während der Gewebe-Präparation zurückzuführen sein, da diese Antikörper auch an Paraffinschnitten der Transplantate nicht, an unfixierten Kryostatschnitten dagegen sehr wohl nachweisbar sind. Daß sich die Art der Gewebe-Präparation maßgeblich auf die Reaktivität und somit die Darstellbarkeit monoklonaler Antikörper auswirkt, geht aus zahlreichen Untersuchungen hervor (Van Ewijk et al., 1980; Hansmann et al., 1984; Walker et al., 1984; Taylor, 1985). Durch Fixation und Einbettung können labile Antigen, insbesondere auch zellmembran-gebundene tumor-assoziierte Antigene, leicht zerstört oder in einem Maße alteriert werden, daß sie auch mit hochempfindlichen Nachweismethoden nicht mehr lokalisierbar sind.

Die immunochemische Darstellbarkeit von monoklonalen Antikörpern kann auf mehrere Arten beeinflußt werden. Zunächst kann die Selektion der Antikörper, frühzeitig nach der Fusion, nach ihrem vorgesehenen Verwendungszweck erfolgen (Priestley und Cuello, 1983). So können z.B. gezielt solche Klone selektiert werden, deren Antikörper mit routinemäßig fixiertem, paraffin-eingebettetem Gewebe reagieren. Hierbei besteht jedoch die Gefahr, daß wertvolle Klone mit der gewünschten Spezifität ausselektiert werden. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die Gewebepreparation, insbesondere die Fixation, den Erfordernissen einzelner MAK anzupassen. In der vorliegenden Untersuchung wurde mit einer Mischung aus Paraformaldehyd und Glutaraldehyd (4%/1%) ein Fixativ gefunden, das einerseits den Nachweis aller untersuchten MAK erlaubte, andererseits auch die Anforderungen der Elektronenmikroskopie - hinlänglich Konservierung der Ultrastruktur - erfüllte. Die Eignung von Formaldehyd-/Glutaraldehyd-Fixativen zur immunochemischen Darstellung monoklonaler Antikörper wurde von anderen Untersuchern bestätigt (Cuello et al., 1980; Priestley et al., 1982).

Durch die Verwendung von unfixierten Kryostatschnitten zur Immunhistochemie können die Probleme der Gewebepreparation weitgehend umgangen werden. Die Reaktion aller acht untersuchten MAK konnte an Gefrierschnitten der Transplantate, z.T. auch mit der weniger empfindlichen indirekten Immunperoxidasefärbung, dargestellt werden; dies war mit der sensibleren PAP-Technik auch noch möglich, nachdem die Schnitte in 4% Paraform-/1% Glutaraldehyd fixiert worden waren. Dieses Verfahren wurde daher gewählt, um die Antikörperbindung an Tumorgewebe immunelektronenmikroskopisch darzustellen. Um die Penetration der Antikörper in tiefere Gewebsschichten zu verbessern, mußten die Schnitte mit einem

Detergens vorbehandelt werden, da Immun-Reagenzien in fixierte Gewebe ohne Vorbehandlung maximal 1-2 μm tief eindringen (Pelletier und Morel, 1984). Piekut und Casey (1983) konnten die Penetration durch Vorbehandlung fixierter Schnitte mit 0,4%iger Triton X-100 Lösung auf 8-9 μm erhöhen. Da Detergentien sich nachteilig auf die Gewebe-Ultrastruktur auswirken, wurden die Schnitte in der vorliegenden Untersuchung in einer nur 0,1%igen Triton X-100-Lösung 60 min präinkubiert. Trotz dieser Vorbehandlung erwies sich bei der Anfertigung der Ultradünnschnitte das Auffinden einer immunochemisch optimal gefärbten Schnittebene als schwierig.

Durch Postembedding-Verfahren konnte keiner der untersuchten MAK dargestellt werden, obwohl die Methode mehrfach modifiziert wurde. Weder durch Verringerung der Fixativ-Konzentration noch durch Einbettung in ein hydrophiles Methacrylatkunstharz (LR-White^R), das Gewebe bereits aus 70%igem Alkohol annimmt, konnten positive Resultate erzielt werden. Ähnliche Erfahrungen machten Van Duinen et al. (1984), die in Preembedding-Verfahren sechs MAK gegen Zelloberflächenantigene von Melanocyten immunelektronenmikroskopisch darstellen konnten; keines dieser Antigene war an Epon^R-Ultradünnschnitten nachweisbar. Es ist daher anzunehmen, daß durch Dehydration und Kunstharzeinbettung die Mehrzahl der von MAK erkannten Zelloberflächenantigene zerstört oder aus dem Gewebe gelöst werden. Allerdings könnte die ultrastrukturelle Nicht-Nachweisbarkeit gliomassoziiierter Zelloberflächenantigene im Postembedding-Verfahren auch einen quantitativen Aspekt haben: Anders als in Preembedding-Verfahren, wo ein großer Teil der Zelloberfläche für die Reaktion zur Verfügung steht, ist nicht ohne weiteres davon auszugehen, daß bei einer notgedrungen zufällig gelegten ultradünnen Schnittebene

durch die Zelle genügend MAK-Bindungsstellen so getroffen werden, daß es zu einer mit den angewandten Methoden nachweisbaren Reaktion kommt. Die Möglichkeiten zur immunelektronenmikroskopischen Darstellung dieser Antigene sind daher auf Preembedding-Verfahren beschränkt. Möglicherweise könnten, analog zur Gefrierschnittechnik in der Immunhistologie, die Probleme sowohl der Preembedding- als auch der Postembedding-Technik durch den Einsatz der Kryoultramicrotomie, zumindest teilweise, gelöst werden.

In der vorliegenden Untersuchung wurde bei einem Teil der Antikörper die Fähigkeit zur selektiven Bindung an Gliomzellen festgestellt. Damit ist eine wichtige Voraussetzung für die Anwendung monoklonaler Antikörper zur in vivo-Diagnostik erfüllt. Eine erfolgversprechende Möglichkeit liegt in der Koppelung der Antikörper mit Radionucliden. So konnten durch Verabreichung J^{131} -markierter monoklonaler Antikörper gegen Gliomantigene an tumortragende, immundefiziente Mäuse deutliche Aktivitätsanreicherungen im Tumorgewebe erzielt und durch externe Szintigraphie dargestellt werden (Bourdon et al., 1984; Stavrou et al., 1985). Analoge diagnostische Versuche wurden bereits an menschlichen Tumorpatienten durchgeführt (Mach et al., 1981; Epenetos et al., 1982; Farrands et al., 1982; Phillips et al., 1983). Darüberhinaus könnten monoklonale Antikörper aufgrund ihrer komplementabhängigen und zellvermittelten Cytotoxizität oder nach Koppelung an cytotoxische Substanzen als "Immuntoxine" künftig therapeutische Anwendung finden. Eine entsprechende in vivo-Anwendung der in dieser Arbeit beschriebenen Antikörper an gliomtragenden Hunden kann möglicherweise dazu beitragen, noch offene Fragen sowohl der Immundiagnostik als auch der Immuntherapie mit monoklonalen Antikörpern zu beantworten.

E. Zusammenfassung

Zwei spontane Gehirntumoren des Hundes sowie daraus abgeleitete Langzeit-Zellkulturen und Transplantations-tumoren wurden immunochemisch auf Expression nerven-system-spezifischer Antigene untersucht. Im Astrozytom N 166/77 ebenso wie in der davon etablierten Zelllinie 77DG-G-166 wurde die Expression der Gliaproteine S-100 und GFAP nachgewiesen; von den Zellen des anaplastischen Oligodendroglioms N 422/83 und der Zellkultur 83DG-G-422 wurde keines dieser Markerproteine gebildet.

Gegen die Gliomzelllinie 83DG-G-422 wurden monoklonale Antikörper (MAK) hergestellt, indem Milzzellen von mit TNBS-modifizierten Gliomzellen immunisierten BALB/c-Mäusen mit X63-Ag8.653-Maus-Myelomzellen fusioniert wurden. Als Fusionsvermittler diente eine 100%ige Poly-äthylenglycol-Lösung; die entstandenen Hybridomzellen wurden mit Mäuse-Peritonealzellen als "feeder-layer" kultiviert. 32 antikörperproduzierende Hybridomkolonien wurden mit einer Endpunktverdünnungsmethode kloniert und die Überstände gegen Gliom- und normale Hundezellen getestet. 4 MAK, die nur mit Gliomzellen oder neuro-ektodermalen Zellen reagierten, wurden selektiert und zusammen mit 4 weiteren, gegen die Gliomzelllinie 77DG-G-166 gerichteten MAK an permanenten Tumorzell-kulturen verschiedener Species getestet. Es wurden gemeinsame antigene Determinanten bei Gliom-, Melanom- und Meningiomzellen des Hundes nachgewiesen; einzelne MAK zeigten Kreuzreaktionen mit Zellen eines humanen Melanoms, eines chemisch induzierten Rattenglioms sowie verschiedener Mini-Pig Melanome.

Die Bindungsreaktion monoklonaler Antikörper wurde durch immunochemische Methoden licht- und elektronenmikroskopisch sichtbar gemacht. Für die Lichtmikroskopie wurden Gliomzellen mit der indirekten Immunperoxidase- und der Avidin-Biotin-Technik gefärbt. Aufgrund des unterschiedlichen Färbeverhaltens einzelner MAK konnten Rückschlüsse auf die heterogene Antigenexpression der Gliomzelllinie 83DG-G-422 gezogen werden. Durch die Avidin-Biotin-Methode und eine 3-stufige PAP-Technik konnte die Reaktion von 4 bzw. 5 MAK an Paraffinschnitten dargestellt werden.

Verschiedene Fixative wurden auf ihre Eignung zur immunelektronenmikroskopischen Darstellung der Antikörperbindung untersucht. Durch pikrin- und essigsäurehaltige Lösungen wurde die Reaktivität einzelner MAK vermindert oder aufgehoben. Nach Fixation mit einem Gemisch aus 4% Paraformaldehyd/1% Glutaraldehyd blieben sowohl Antigenität als auch die Ultrastruktur des Tumorgewebes in ausreichendem Maße erhalten.

In Preembedding-Verfahren wurden Gliomzellen mit der indirekten Immunperoxidasefärbung, 30 µm dicke Kryostatsschnitte von Tumorgewebe durch eine PAP-Methode gefärbt; als elektronendichtes Substrat diente 3,3'-Diaminobenzidin. In beiden Fällen war das Reaktionsprodukt an der Oberfläche der Gliomzellen lokalisierbar. Durch Postembedding-Verfahren waren diese Membranantigene, auch nach Einbettung des Tumormaterials in hydrophiles Methacrylat-Harz, nicht nachweisbar.

Summary

PRODUCTION AND IMMUNOCHEMICAL INVESTIGATIONS OF MONO-CLONAL ANTIBODIES AGAINST CANINE BRAIN TUMORS

Two spontaneous canine gliomas and the permanent cell-lines and tumor xenografts derived therefrom were examined for expression of nervous system specific antigens by immunohistochemistry. Cells from the astrocytoma N 166/77 were shown to produce protein S-100 and glial fibrillary acidic protein; none of these marker proteins were expressed by N 422/83 oligodendroglioma cells.

Monoclonal antibodies (Mab's) were produced by fusion of X63-Ag8.653 mouse myeloma cells and spleen cells from mice primed with chemically modified 83DG-G-422 glioma cells. Fusion was promoted by a 100% poly-ethyleneglycol solution, and hybridomas were grown on mouse peritoneal cells as feeder layer. 32 antibody producing hybridoma colonies were cloned by limiting dilution. Antibodies were tested against normal canine fibroblasts, brain and kidney cells by indirect immunoperoxidase staining. 4 Mab's reacting only with glioma cells or cells from neuroectodermal origin were selected. These, and 4 Mab's raised against the glioma cell line 770G-G-166 were tested for cross reactivity with established tumor cell lines from various species. Shared antigenic determinants were detected on canine glioma, melanoma and meningioma cells; some antibodies showed cross reactivity with human melanoma cells, chemically induced rat glioma and mini-pig melanoma cells.

Binding of monoclonal antibodies was visualized by light and electron microscopic immunocytochemistry. For light microscopy cultured glioma cells were stained by immunoperoxidase and avidin-biotin-techniques. Distinct staining patterns of monoclonal antibodies showed antigenic heterogeneity of the glioma cell line 83DG-G-422 and homogeneous antigen expression by 77DG-G-166 glioma cells. Using a 3-step PAP-technique and an avidin-biotin system the reaction of 4 monoclonal antibodies could be demonstrated on paraffin sections of primary gliomas, 5 antibodies stained paraffin sections of tumor xenografts grown in nude mice.

Different fixation reagents were tested for immunoelectron microscopy. Some fixatives, e.g. those containing acidic or picric acid, reduced or abolished the reactivity of monoclonal antibodies. A mixture of 4% paraformaldehyde/1% glutaraldehyde was found to be suitable for preservation of both ultrastructure and antigenicity.

Using preembedding methods glioma cells were stained by indirect immunoperoxidase and 30 μ m cryostat tumor sections by a 3-step PAP-technique, using diaminobenzidine as substrate for peroxidase. With all of 8 monoclonal antibodies tested, reaction products were confined to the cell surface of glioma cells. No antibody localization was possible by postembedding PAP-techniques using ultrathin sections of Epon^R and LR-White^R methacrylate embedded cells and tissues.

F. Literaturverzeichnis

Albrechtsen, M., van Gerstenberg, A.C., Bock, E.:

Mouse monoclonal antibodies reacting with human brain glial fibrillary acidic protein.

J. Neurochem. 42, 86-93 (1984)

Ashwood-Smith, M.J.:

Preservation of mouse bone marrow at 79°C with dimethyl sulfoxide.

Nature, 190, 1204-1205 (1961)

Avrameas, S.:

Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies.

Immunochemistry 6, 43 (1969)

Baker, M.A., Taub, R.N.:

Immunotherapy of human cancer.

Progr. Allergy 17, 227-299 (1973)

Bilzer, Th., Stavrou, D., Dahme, E., Anzil, A.P.:

Cell-mediated immune response in rats immunized with chemically modified syngeneic glioma cells. Monitoring by in vivo parameters and in vitro immune cytotoxicity.

Anticancer Res. 2, 345-354 (1982)

Boorsma, D.M.:

Direct immunoenzyme double staining applicable for monoclonal antibodies.

Histochemistry 80, 103-106 (1984)

Bourdon, M.A., Coleman, R.E., Blasberg, R.G., Groothuis, D.R., Bigner, D.D.:

Monoclonal antibody localization in subcutaneous and intracranial human glioma xenografts: Paired - label and imaging analysis.

Anticancer Res. 4, 133-140 (1984)

Bourdon, M.A., Wikstrand, C.J., Furthmayr, H., Matthews, T.J. Bigner, D.D.:

Human glioma-mesenchymal extracellular matrix antigen defined by monoclonal antibody.

Cancer Res. 43, 2796-2805 (1983)

Bourguignon, L.Y.W., Balazovich, K., Trowbridge, I.S., Hyman, R.:

Immunoelectron microscopic localization of Thy-1 glycoprotein in wild type and Thy-1-negative lymphoma cells.

Cell Biol. Intern. Rep. 6, 745-755 (1982)

Broadwell, R.O., Oliver, C., Brightman, M.W.:

Localization of neurophysin within organelles associated with protein synthesis packaging in the hypothalamo-neurohypophyseal system: An immunocytochemical study.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 5999-6003 (1979)

- Brown, J.P., Nishiyama, K., Hellström, I., Hellström, K.E.:
Structural characterization of human melanoma associated antigen p97
with monoclonal antibodies.
J. Immunol. 127, 539-546 (1981)
- Buijs, R.M., Swaab, D.F.:
Immuno-electron microscopical demonstration of vasopressin and
oxytocin synapses in the limbic system of the rat.
Cell Tiss. Res. 204, 355-365 (1979)
- Cahan, L.D., Irie, R.F., Singh, R., Cassidenti, A., Paulson, J.C.:
Identification of a human neuroectodermal tumor antigen (OFA-1-2) as
ganglioside GD2.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 7629-7633 (1982)
- Carrel, S., deTribolet, N., Gross, N.:
Expression of HLA-DR and common acute lymphoblastic leukemia antigens
on glioma cells.
Eur. J. Immunol. 12, 354-357 (1982)
- Carrel, S., Schmidt-Kessen, A., Mach, J.P., Heumann, D.,
Girardet, C.:
Expression of common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA) on
human malignant melanoma cell lines.
J. Immunol. 130, 2456-2460 (1983)
- Celio, M.R., Lutz, H., Binz, H.:
Protein A in immunoperoxidase techniques.
J. Histochem. Cytochem. 27, 691-693 (1979)
- Clevenger, C.V., Epstein, A.L.: Use of immunogold electron microscopy
and monoclonal antibodies in the identification of nuclear
substructures.
J. Histochem. Cytochem. 32, 757-765 (1984)
- Coakham, H.B.:
Surface antigen(s) common to human astrocytoma cells.
Nature 250, 328-330 (1974)
- Coakham, H.B., Lakshmi, M.S.:
Tumor-associated surface antigen(s) in human astrocytomas.
Oncology 31, 233-243 (1975)
- Coakham, H.B., Kornblith, P.L., Quindien, E.A., Pollok, L.A.,
Wood, W.C., Harnett, L.C.:
Autologous humoral response to human gliomas and analysis of certain
cell surface antigens: In vitro study with the use of
microcytotoxicity and immune adherence assays.
J. Nat. Canc. Inst. 64, 223-233 (1980)

Coakham, H.B.:

Immunology of human brain tumors.

Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 20, 145-149 (1984)

Collins, V.P., Moser, R.:

Monoclonal antibodies to glial fibrillary acidic protein.

Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. A 91, 269-279 (1983)

Consolazione, H., Milstein, C., Wright, B., Cuello, A.C.:

Immunocytochemical detection of serotonin with monoclonal antibodies.

J. Histochem. Cytochem. 29, 1425-1430 (1981)

Coons, A.H., Creech, H.J., Jones, R.N.:

Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group.

Proc. Soc. Exp. Biol. 47, 200-202 (1941)

Coppe, Ph., Letesson, J.J., Saint-Guillain, M., Leloup, R.:

The use of colloidal gold for screening monoclonal antibodies to cell surface antigens.

J. Immunol. Methods 76, 211-222 (1985)

Craviotto, H.:

Immunology of experimental brain tumors.

In: Waters, H. (ed): Handbook of cancer immunology.

New York - London, Garland STPM Press, 1978

Cuello, A.C., Galfré, G., Milstein, C.:

Detection of substance P in the central nervous system by a monoclonal antibody.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 3532-3536 (1979)

Cuello, A.C., Galfré, G., Milstein, C.:

Development of a monoclonal antibody against a neuroactive peptide.

Immunocytochemical applications.

In: Pepeu, G., Kuhar, M.J., Enna, S.J. (eds): Receptors for

Neurotransmitters and Peptide Hormones, pp 349-363.

Raven Press, New York, 1980

Dahme, E., Müller, B., Schröder, B., Stavrou, D.:

Morphologische und zytochemische Befunde an zwei in vitro etablierten spontanen Hirntumoren des Hundes.

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 93, 21-27 (1980)

Davidson, R.L., Gerald, P.S.:

Improved techniques for the induction of mammalian cell hybridization by polyethylene glycol.

Somatic Cell Genet. 2, 165-176 (1976)

DeMey, J., Hoekeke, J., De Brabander, M., Geuens, G., Joniau, M.:
Immunoperoxidase visualization of microtubules and microtubular
proteins.

Nature (London) 264, 273-274 (1976)

Deryagin, B.V. und Landau, L.:

Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the
adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes.

Acta Physiochim. URSS 14, 633-662 (1941)

De Waele, M., De Mey, J., Moeremans, M., De Brabander, M.,
Van Camp, B.:

Immunogold staining method for the detection of cell surface antigens
with monoclonal antibodies.

In: Bullock, G.R. und Petrusz, P. (eds): Techniques in
Immunocytochemistry, Vol. 2. Academic Press, London, 1-23; 1983

De Waele, M.:

Haematological electron immunocytochemistry. Detection of cell
surface antigens with monoclonal antibodies.

In: J.M Polak and I.M. Varndell (eds): Immunolabelling for Electron
Microscopy. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 267-288
(1984)

Dippold, W.G., Knuth, A., Meyer zum Büschenfelde, K.H.:

Inhibition of human melanoma cell growth in vitro by monoclonal
anti-G_{D3}-ganglioside antibody.

Cancer Res. 44, 806-810 (1984)

Dippold, W.G., Lloyd, K.O., Li, L.T., Ikeda, H., Oettgen, H.F.,
Old, L.J.:

Cell surface antigens of human malignant melanoma: definition of six
antigenic systems with mouse monoclonal antibodies.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 6114-6118 (1980)

Eng, L.F., Vanderhaeghen, J.J., Bignami, A., Gerstl, B.:

An acidic protein isolated from fibrous astrocytes.

Brain Res. 28, 351-354 (1971)

Epenetos, A.A., Bodmer, W.F., Britton, K.E.:

Radioimmunodetection of cancer.

Eur. J. Clin. Oncol. 18, 1221-1223 (1982)

Falini, B., Tabilio, A., Zuccaccia, M.:

Protein A-peroxidase conjugates for two-stage immunoenzyme staining
of intracellular antigens in paraffin-embedded tissues.

J. Immunol. Methods 39, 111-120 (1980)

Farr, A.G., Nakane, P.K.:

Use of anti-hapten in immunohistochemistry and immunoassay, abstracted.

J. Histochem. Cytochem. 29, 831 (1981)

Farrands, P.A., Pimm, M.V., Embleton, M.J., Perkins, A.C.,

Hardy, J.D., Baldwin, R.W., Hardcastle, J.D.:

Radioimmunoassay of human colorectal cancers by anti-tumor monoclonal antibody.

Lancet, 387-400 (1982)

Faulk, W.P. und Taylor, G.M.:

An immunocolloid method for the electron microscope.

Immunocytochemistry 8, 1081-1083 (1971)

Fazekas de St.Groth, S., Scheidegger, D.:

Production of monoclonal antibodies. Strategy and tactics.

J. Immunol. Methods 35, 1-21 (1980)

Fields, K.L. und Raine, C.S.:

Ultrastructure and Immunocytochemistry of rat Schwann cells and fibroblasts in vitro.

J. Neuroimmunol. 2, 155-166 (1982)

Freed, J.J., Schatz, S.A.:

Chromosomal alteration in cultured cells deprived of single essential amino acids.

Exp. Cell Res. 55, 393-409 (1969)

Galfré, G., Butcher, G.W., Howard, I.C., Wilde, C.D., Milstein, C.:
Clonal competition and stability of hybrid myelomas of mouse and rat origin.

Transplantation Proc. XII, No. 3, 371-375 (1980)

Galfré, G., Howe, S.C., Milstein, C.:

Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines.

Nature 266, 550-552 (1977)

Gerhard, W., Yewdell, J., Frankel, M.E., Lopes, A.D., Staudt, L.:

Monoclonal antibodies against influenza virus.

In: Kennett, R.H., McKearn, T.J., Bechtol, K.B. (eds): Monoclonal Antibodies, Plenum Press, 1980

Gheuens, J., de Schutter, E., Noppe, M., Lowenthal, A: Identification of several forms of the glial fibrillary acidic protein, or alpha-albumin, by a specific monoclonal antibody.

J. Neurochem. 43, 964-969 (1984)

Goodman, S.L. und Newman, R.A.:

Collateral immunoprecipitation and localization of cellular antigens using monoclonal antibody-gold conjugates.

Exp. Cell Res. 144, 209-214 (1983)

Graham, R.C. Lundholm, U., Karnovsky, M.J.:

Cytochemical demonstration of peroxidase activity with 3-amino-ethyl-carbazole.

J. Histochem. Cytochem. 13, 150-152 (1965)

Graham, R.C. und Karnovsky, M.J.:

The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique.

J. Histochem. Cytochem. 14, 291 (1966)

Hansmann, M.L., Radzun, H.J., Kaiserling, E., Parwaresch, M.R.:

Immunoelectron microscopic demonstration of tissue antigens with monoclonal antibodies.

Virchows Arch. (Cell Pathol.) 46, 1-12 (1984)

Hawkes, R., Niday, E., Matus, A.:

Monoclonal antibodies identify novel neural antigens.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 2410-2414 (1982)

Hellström, I., Hellström, K.E., Pierce, G.E., Bill, A.H.:

Demonstration of cell-bound and humoral immunity against neuroblastoma cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. 60, 1231-1238 (1968)

Hellström, I., Garrigues, H.J., Cabasco, L., Mosley, G.H.,

Brown, J.P., Hellström, K.E.:

Studies of a high molecular weight human melanoma-associated antigen.

J. Immunol. 130, 1467-1472 (1983)

Helson, L., Helson, C., Weinberger, C.:

DW-1 monoclonal antibody and neuroectodermal tumors.

Proc. Amer. Assn. Cancer Res. 24, 130 (1983)

Hengartner, H., Luzzati, A.L., Schreier, M.:

Fusion of in vitro immunized lymphoid cells with X63-Ag.8.

Curr. Top. Microbiol. Immunol. 81, 92-99 (1978)

Herbermann, R.B.:

Immunogenicity of tumor antigens.

Biochem. Biophys. Acta 473, 93-119 (1977)

- Herlyn, M., Steplewski, Z., Koprowski, H.:
Antigens detected by monoclonal antibodies against human melanoma.
(San Diego Meeting, May, 1980)
Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 21, 210 (1980)
- Hirn, M., Pierres, M., Deagostini-Bazin, H., Hirsch, M.R.,
Goridis, C., Ghandour, M.S., Langley, O.K., Gombos, G.:
A new brain cell surface glycoprotein identified by monoclonal
antibody.
Neuroscience 7, 239-250 (1982)
- Houghton, A.N., Brooks, H., Cote, R.J., Taormina, M.C.,
Oettgen, H.F., Old, L.J.:
Detection of cell surface and intracellular antigens by human
monoclonal antibodies.
J. Exp. Med. 158, 53-65 (1983)
- Hsu, S.M., Raine, L., Fanger, H.:
Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase
techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP)
procedures.
J. Histochem. Cytochem. 29, 577-580 (1981)
- Jasani, B., Thomas, D.W., Williams, E.D.:
Use of monoclonal antihapten antibodies for immunolocalization of
tissue antigens.
J. Clin. Pathol. 34, 1000-1002 (1981)
- Jonak, Z.L.:
Isolation of monoclonal antibodies from supernatant by
(NH₄)₂SO₄ precipitation.
In: R.H. Kennett (ed): Monoclonal antibodies.
Plenum Press, New York, 1980
- Kearney, J.F., Radbruch, A., Liesegang, B., Rajewsky, K.:
A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression
but permits the construction of antibody secreting hybrid cell lines.
J. Immunol. 123, 1548-1550 (1979)
- Kehayov, I.R.:
Tumor-associated water-soluble antigen(s) in human glioblastoma
demonstrated by immunodiffusion and immunoelectrophoresis.
Ann. Immunol. 127, 703-716 (1976)
- Kennett, R.H. und Gilbert, F.:
Hybrid myelomas producing antibodies against a human neuroblastoma
antigen present on fetal brain.
Science 203, 1120-1121 (1979)

- Kennett, R.H., Jonak, Z.L., Bechtol, K.B.:
Monoclonal antibodies against human tumor-associated antigens.
In: R.H. Kennett (ed): Monoclonal antibodies.
Plenum Press (1980)
- Klein, G.:
Tumor antigens.
Amer. Rev. Microbiol. 20, 223-252 (1966)
- Köhler, G., Milstein, C.:
Continuous cultures of fused cells secreting antibodies of predefined specificity.
Nature 256, 495-497 (1975)
- Köhler, G., Howe, S.C., Milstein, C.:
Fusion between immunoglobulin secreting and nonsecreting myeloma cell lines.
Eur. J. Immunol. 6, 292-295 (1976)
- Koprowsky, H., Steplewski, Z., Herlyn, D., Herlyn, M.:
Study of antibodies against human melanoma produced by somatic cell hybrids.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 3405-3409 (1978)
- Kornblith, P.L., Dohan, F.C., Wood, W.C., Whiteman, B.O.:
Human astrocytoma serum mediated immunologic response.
Cancer 33, 1512-1519 (1974)
- Lagenauer, C., Schachner, M.:
Monoclonal antibody (M_2) to glial and neuronal cell surfaces.
J. Supramol. Struct. Cell. Biochem. 15, 335-346 (1981)
- Lee, V.M.-Y., Page, C.D., Wu, H.-L., Schlaepfer, W.W.:
Monoclonal antibodies to gel-excised glial filament protein and their reactivities with other intermediate filament proteins.
J. of Neurochemistry 42, 25-32 (1984)
- Lemonnier, F., Burakoff, S.J., Germain, R.N., Benacerraf, B.:
Cytolytic thymus-derived lymphocytes for allogenic stimulator cells crossreact with chemically modified syngeneic cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 1229-1233 (1977)
- Liao, S.K., Clarke, B.J., Kwong, P.C., Brickerden, A.,
Gallie, B., Deut, P.B.:
Common neuroectodermal antigens on human melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma, glioblastoma and fetal brain revealed by hybridoma antibodies raised against melanoma cells.
Eur. J. Immunol. 11, 450-454 (1981)

Littlefield, J.W.:

Selection of hybrids from mastings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinations.

Science 145, 709 (1964)

Loeffel, S.C., Gillespie, G.V., Mirmiran, S.A., Miller, E.W., Golden, P., Askin, F.B. Siegal, G.P., Hill, Ch.:

Cellular immunolocalization of Si00 protein within fixed tissue sections by monoclonal antibodies.

Arch. Pathol. Lab. Med. 109, 117-122 (1985)

Mach, J.P., Buchegger, F., Forni, M., Ritschard, J., Berche, C., Lumbroso, J.D., Schreyer, M., Girardet, C., Accolla, R.S., Carrel, S.:

Use of radiolabelled monoclonal anti - CEA antibodies for the detection of human carcinomas by external photoscanning and tomoscintigraphy.

Immunol. Today 2, 239-249 (1981)

MacIntyre, E.H., Wintersgill, C.J., Perkins, J.P., Vatger, A.E.:

The response in culture of human tumor astrocytes and neuroblasts to N⁶,O²-Dibutyryl-Adenosine 3',5'-Monophosphoric Acid.

J. Cell. Sci. 11, 639-667 (1972)

Manara, G.C., De Panfilis, G., Ferrari, C., Scandroglio, R.:

Immunoperoxidase-Immunogold double labelling in Immunoelectron-microscopy of large granular lymphocytes.

J. Immunol. Methods 75, 189-192 (1984)

Mason, T.E., Phifer, R.F., Spicer, S.S., Swallow, R.A., Dreskin, R.B.:

An immunoglobulin-enzyme bridge method for localizing tissue antigens.

J. Histochem. Cytochem. 117, 190 (1969)

McLean, I.W., Nakane, P.K.:

Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative: a new fixative for immunoelectron microscopy.

J. Histochem. Cytochem. 22, 1077-1083 (1974)

Meyer, R.:

Beitrag zur Verständigung über die Namengebung in der Geschwulstlehre.

Zbl. allg. Path. path. Anat. 30, 291-296 (1919/20)

Milstein, C., Clark, M.R., Galfré, G., Cuello, A.C.:

Monoclonal antibodies from hybrid myelomas.

In: Fougerau, M. und Dausset, J. (eds): Progress in Immunology.

Academic Press, New York, 1980

Moore, B.W.:

A soluble protein characteristic of the nervous system.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 19, 739-744 (1965)

Morgan, C.:

Use of ferritin-conjugated antibodies in electron microscopy.
Int. Rev. Cytol. 32, 291-326 (1972)

Moriarty, G.C., Halmi, N.J.:

Electron microscopic localization of the adrenocorticotropin-producing cell with the use of unlabeled antibody and the peroxidase-antiperoxidase complex.
J. Histochem. Cytochem. 26, 590-597 (1972)

Müller, B.:

In vitro Etablierung und partielle Charakterisierung von zwei spontanen Hirntumoren des Hundes.
Diss. med. vet., München, 1978

Nakane, P.K. und Pierce, G.B.:

Enzyme labelled antibodies for the light and electronmicroscopic localization of tissue antigens.
J. Cell Biol. 33, 307-318 (1967)

Nakane, P.K.:

Simultaneous localization of multiple tissue antigens using the peroxidase-labeled antibody method: a study on pituitary glands of rat.
J. Histochem. Cytochem. 16, 557-560 (1968)

Nash, D.R., Crabbe, P.A., Heremans, J.F.:

Sequential immunofluorescent staining: a simple and useful technique.
Immunology 16, 785-789 (1969)

Newman, G.R., Jasani, B., Williams, E.D.:

The Preservation of ultrastructure and antigenicity.
J. Microsc. 127, RP5-RP6 (1982)

Nexø, B.A.:

A plaque assay for murine leukemia virus using enzyme-coupled antibodies.
Virology 77, 849-852 (1977)

Nicolson, G.L., Singer, S.J.:

Ferritin conjugated plant agglutinins as specific saccaride stains for electron microscopy.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 942-945 (1971)

Oger, J., Szuchet, S., Antel, J., Arnason, B.G.W.:
A monoclonal antibody against human T suppressor lymphocytes binds specifically to the surface of cultured oligodendrocytes.
Nature 295, 66-68 (1982)

Old, L.J., Boyse, E.A.:
Immunology of experimental tumors.
Amer. Rev. Med. 15, 167-186 (1969)

Ouchterlony, Ö.:
Diffusions-in-gel-methods for immunological analysis II.
Prog. Allergy 6, 30-154 (1962)

Parshad, R., Sanford K.K.:
Effekt of horse serum, fetal calf serum and bovine serum on neo-plastic conversions and chromosomes of mouse embryo cells in vitro.
J. Natl. Cancer Inst. 41, 767-779 (1968)

Pateraki, E., Guesdon, J.L., Serie, C., Avrameas, S.:
TERELISA: the ELISA test performed in Terasaki plates.
J. Immunol. Meth. 46, 361-368 (1981)

Pearse, A.G.E.:
Histochemistry.
Churchill Livingstone 1972

Pelletier, G., Morel, G.:
Immunoenzyme techniques at the electron microscopial level.
In: Polak, J.M. and Varndell, I.M. (eds): Immunolabelling for Electron Microscopy, pp 83-93, Elsevier, New York, 1984.

Pfreundschuh, M., Siku, H., Takahshi, T., Ueda, R., Ransohoff, J., Oettgen, H.F., Old, L.J.:
Serological analysis of cell surface antigens of human malignant brain tumors.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75, 5122-5216 (1978)

Phillips, J., Alderson, T., Sikora, K., Watson, J.:
Localization of malignant glioma by a radiolabelled human monoclonal antibody.
J. Neurol. Neuros. Psych. 46, 338-392 (1983)

Pickel, V.M., Joh, T.H., Reis, D.J.:
Ultrastructural localisation of tyrosine hydroxylase in noradrenergic neurons of brain.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 659.663 (1975)

Pickel, V.M., Joh, I.H., Reis, D.J.:

Monoamine-synthesising enzymes in central dopaminergic, noradrenergic and serotonic neurons. Immunocytochemical localisation by light and electron microscopy.

J. Histochem. Cytochem. 24, 792-806 (1976)

Pickel, V.M.:

Immunocytochemical Methods.

In: Heimer, L. und Robards, M.J. (eds): Neuroanatomical Tract Tracing Methods, 483-509. Plenum Press, New York, 1981

Piekut, D.T., Casey, S.M.:

Penetration of immunoreagents in vibratome-sectioned brain: a light and electron microscopy study.

J. Histochem. Cytochem. 31, 669-674 (1983)

Ponder, B.A., Wilkinson M.M.:

Inhibition of endogenous tissue alkaline phosphatase with the use of alkaline phosphatase conjugates in immunohistochemistry.

J. Histochem. Cytochem. 29, 981-984 (1981)

Posner, M.R., Antoniou, D., Griffin, J., Schlossman, S.F., Lazarus, H.:

An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of monoclonal antibodies to cell surface antigens on viable cells.

J. Immunol. Methods 48, 23-31 (1982)

Priestley, J.V., Somogyi, P., Cuello, A.C.:

Immunocytochemical localisation of substance P in the trigeminal nucleus of the rat: a light and electron microscopic study.

J. Comp. Neurol. 211, 31-49 (1982)

Priestley, J.V., Cuello, A.C.:

Electron microscopic immunocytochemistry for CNS transmitters and transmitter markers.

In: Cuello, A.C. (ed): Immunohistochemistry, John Wiley, New York, 1983

Pukel, C.S., Lloyd, K.O., Travassos, L.R., Dippold, W.G., Oettgen, H.F., Old, L.J.:

GD₃, a prominent ganglioside of human melanoma. Detection and characterization by mouse monoclonal antibody.

J. Exp. Med. 155, 1133-1138 (1982)

Ranscht, B., Clapshaw, P.A., Price, J., Noble, M., Seifert, W.:

Development of oligodendrocytes and Schwann cells studied with a monoclonal antibody against galactocerebroside.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 2709-2713 (1982)

Reif, A.E. und Allen, J.M.:

The AKR thymic antigen and its distribution in leukemias and nervous tissues.

J. Exp. Med. 120, 413-433 (1964)

Rubinstein, L.J.:

Morphological problems of brain tumors with mixed cell population.

In: Zülch and Woolf: Classification of brain tumors.

Acta neurochir. (Wien) 10, 141-148 (1964)

Saxton, R.E., Torbett, M., Nestor, M., Fairhurst, M., Cochran, A.J.,

Eilber, F.R., Burk, M.W.:

Four distinct melanoma cell surface antigens defined by monoclonal antibodies.

Proc. Amer. Assn. Cancer Res. 24, 894 (1983)

Schmid, J., Erfle, V.:

Elimination of mycoplasmas from cell cultures and establishment of mycoplasma-free cell lines.

Exp. Cell Res. 152, 565-570, (1984)

Schnegg, J.F., Diserens, A.C., Carrel, S., Accolla, R.S.,

de Tribolet, N.:

Human glioma-associated antigens detected by monoclonal antibodies.

Cancer Res. 41, 1209-1213 (1981)a

Schnegg, J.F., de Tribolet, N., Diserens, A.C., Martin-Achard, A.,

Carrel, S.:

Characterisation of a rabbit anti human malignant glioma antiserum.

Int. J. Cancer 28, 265-269 (1981)b

Seeger, R.C., Rosenblatt, H.M., Imai, K., Ferrone, S.:

Common antigenic determinants on human melanoma, glioma, neuroblastoma, and sarcoma cells defined with monoclonal antibodies. Cancer Res. 41, 2714-2717 (1981)

Seeger, R.C., Danon, Y.L., Rayner, S.A., Hoover, S.:

Definition of Thy-1 determinant on human neuroblastoma, glioma, sarkoma, and teratoma cells with a monoclonal antibody.

J. Immunol. 128, 983-989 (1982)

Sikora, K., Alderson, T.:

Human hybridomas from malignant gliomas.

The lancet 2, 11-14 (1982)

Solheid, C., Lauro, G., Palladine, G.:

Two separate membrane-bound antigens on human glioma cells in tissue culture detected with sera from glioma patients by immunofluorescence.

J. Neurol. Sci. 30, 55-64 (1976)

Somogyi, P., Hodgson, A.J., Smith, A.D.:

An approach to tracing neuron networks in the cerebral cortex and basal ganglia.

Neuroscience 4, 1805 (1979)

Somogyi, P., Takagi, H.:

A note on the use of picric acid-paraformaldehyde-glutaraldehyde fixative for correlated light and electron microscopic immunocytochemistry.

Neuroscience 7, 1779-1783 (1982)

Stavrou, D., Elling, H., Haglid, K.G.:

Demonstration of humoral antibodies against autologous cells in experimental rabbit gliomas.

J. Neuropath. Exp. Neurol. 37, 694 (1978)

Stavrou, D., Hultén, M., Anzil, A.P., Bilzer, Th.:

The humoral antibody response of rats immunized with chemically modified syngeneic brain cells and glioma cells.

Int. J. Cancer 26, 629-637 (1980)

Stavrou, D., Bilzer, Th., Hultén, M.:

Protektiver Effekt gegen syngene Gliomtransplantate durch Immunisierung mit chemisch modifizierten Gliomzellen.

Zbl. allg. Path. 125, 572 (1981)

Stavrou, D., Bilzer, Th., Hultén, M., Zänker, K.S., Anzil, A.P., Haglid, K.G., Dahme, E.:

Immunological aspects of experimental brain tumors.

Anticancer Res. 2, 151-156 (1982)

Stavrou, D., Süß, C.:

Hybridomas producing monoclonal antibodies against chemically induced gliomas.

J. Neuroimmunol. 3, 241 (1982)

Stavrou, D., Süß, C., Bilzer, Th., Kummer, U., de Tribolet, N.:

Monoclonal antibodies reactive with glioma cell lines derived from experimental brain tumors.

Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 19, 1439-1449 (1983)

Stavrou, D., Mellert, W., Bilzer, Th., Senekowitsch, R., Keiditsch, E., Mehraein, P.:

Radioimmuno-detection of gliomas by administration of radiolabelled monoclonal antibodies. Experimental data.

Anticancer Res. 5, 147-156 (1985)

Sternberger, L.A.:

Some new developments in immunocytochemistry.

Microscopy 25, 346-361 (1969)

Sternberger, L.A.:

Immunocytochemistry.

John Wiley, New York (1979)

Straus, W.:

Improved staining for peroxidase with benzidine and improved double staining immunoperoxidase procedures.

J. Histochem. Cytochem. 20, 272-278 (1972)

Taylor, C.R.:

Monoclonal antibodies and 'routine'paraffin sections.

Arch. Pathol. Lab. Med. 109, 115-116 (1985)

Thust, R.:

Karyotypveränderungen in Klonen eines N-Methylnitrosoharnstoff-induzierten euploiden Sarkoms der Rückenmarks der Ratte in vitro.

Exp. Path. 5, 226-234 (1971)

de Tribolet, N., Carrel, S.:

Human glioma tumor-associated antigens.

Cancer Immunol. Immunother. 9, 207-211 (1980)

de Tribolet, N., De Muralt, B., Diserens, A.C. et al:

Reactivity spectrum of monoclonal antibodies to human gliomas.

J. Neuroimmunol. 3, 239 (1982)

Trojanowski, J.Q., Lee, V., Pillsbury, N., et al.:

Neuronal origin of esthesioneuroblastoma demonstrated with anti-neurofilament monoclonal antibodies.

N. Engl. J. Med. 307, 159 (1979)

Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.-Y.:

Monoclonal and polyclonal antibodies against neural antigens: diagnostic applications for studies of central and peripheral nervous system tumors.

Human Pathol. 14, 281-285 (1983)

Trojanowski, J.Q., Hickey, W.F.:

Human teratomas express differentiated neural antigens.

Am. J. Pathol. 115, 383-389 (1984)

Trost, T.H., Weil, H.P., Noack, M.:

A new immunoenzyme tracer for localization of antibodies in immunohistology: Peroxidase-labeled Protein A.

J. Cutan. Pathol. 7, 227-235 (1980)

Trouillas, P.:

Carcinofetal antigen in rat glial tumors.

Lancet 2, 552 (1971)

Van der Weij, J.P., Van der Veen, C.J.P., De Vries, E., Cats, A.:
The use of a peroxidase-antiperoxidase complex for the visualization
of monoclonal antibodies on the ultrastructural level.
Clin. Exp. Immunol. 54, 819-826 (1983)

Van Duinen, S.G., Mauw, B.J., De Graaff-Reitsma, C.B., Ruiter, D.J.:
Immunoelectron microscopic methods for demonstration of antigens on
normal melanocytes and other epidermal cells.
Lab. Invest. 50, 733-741 (1984)

Van Ewijk, W., Coffman, R.C., Weissman, I.L.:
Immunoelectron microscopy of cell surface antigens: a quantitative
analysis of antibody binding after different fixation protocols.
Histochem. J. 12, 349-359 (1980)

Wahlström, T., Saksela, E., Troupp, H.:
Cell bound antiglial immunity in patients with malignant tumors of
the brain.
Cell Immunol. 6, 161-170 (1973)

Wahlström, T., Linder, E., Saksela, E., Westermark, B.:
Tumor specific membrane antigens in established cell lines from
gliomas.
Cancer 34, 274-279 (1979)

Walker, W.S., Beelen, R.H.J., Buckley, P.J., Melvin, S.L., Yen, S.E.:
Some fixation of reagents reduce or abolish the detectability of Ia-
antigen and HLA-DR on cells.
J. Immunol. Methods 67, 89-101 (1984)

Weber, K., Rathke, P.C., Osborn, M.:
Cytoplasmic microtubular images in glutaraldehyde-fixed tissue
culture cells by electron microscopy and by immunofluorescence
microscopy.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1820-1824 (1978)

Wikstrand, C.J., Mahaley, M.S., Bigner, D.D.:
Surface antigenic characteristic of human glial brain tumor cells.
Cancer Res. 37, 4267-4275 (1977)

Wikstrand, C.J., Bigner, D.D.:
Surface antigens of human glioma cells shared with normal and fetal
brain.
Cancer Res. 39, 3235-3243 (1979)

Wikstrand, C.J., Bigner, D.D.:
Expression of human fetal brain antigens by human tumors of neuro-
ectodermal origin as defined by monoclonal antibody.
Cancer Res. 42, 267-275 (1982)

Wikstrand, C.J., Bigner, D.D.:

Demonstration of complex antigenic heterogeneity in a human glioma cell line and eight derived clones by specific monoclonal antibodies.

Cancer Res. 43, 3327-3334 (1983)

Wikstrand, C.J., Bigner, D.D.:

Use of monoclonal antibodies in neurobiology and neurooncology.

In: Seel, S. and Reisfeld, R. (eds): Monoclonal antibodies in cancer, Humana press, Clifton, New Jersey, 365-397 (1985)

Zänker, K.S., Stavrou, D., Hultén, M., Bilzer, Th.:

The influence of various chemicals on the surface structure and the antigenicity of syngeneic glioma cells.

Anticancer Res. 1, 101-107 (1981)

Zagury, D., Phalente, L., Bernard, J.:

Anti-peroxidase antibody-secreting hybrid lines: I. Identification, cloning and cell characterization.

Eur. J. Immunol. 9, 1-6 (1979)

Zamboni, L. und De Martino, C.:

Buffered picric-acid formaldehyde: a new rapid fixative for electron-microscopy.

J. Cell Biol. 35, 148A (1967)

Zur Hausen, H., Lange, A., Fröhlich, J.:

Die Serumkonzentration als Auslesefaktor in der Gewebekultur.

Cytogenetische Untersuchungen an Mäusefibroblasten.

Cytologia 31, 339-348 (1966)

Herrn Professor Dr. E. Dahme danke ich für die Überlassung des Dissertationsthemas und die Möglichkeit, die Arbeiten in seinem Hause durchzuführen.

Herrn Dr. Th. Bilzer gilt mein besonderer Dank für jederzeit gewährte freundliche Unterstützung.

Frau G. Boie und Herr W. Tauscher waren mir bei der Durchführung der Experimente eine wertvolle Hilfe.

Für ihre technische Unterstützung bedanke ich mich auch bei Frau D. Wallmann, Frau E. Kemper sowie bei Frau A. Lechner.

Nicht zuletzt danke ich meinem Kollegen Herrn S. Aumann für die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Lebenslauf

- 1954 geboren am 5. August in Dudweiler an der Saar
Vater: Siegmund Schmitt, Polizeibeamter
Mutter: Christine Schmitt, geb. Silbernagel
- 1960-1964 Besuch der Grundschule in St.Ingbert
- 1964-1973 Besuch des Deutsch-Französischen-Gymnasiums
in Saarbrücken
- 1973 29.6. Reifezeugnis
- 1973-1974 Ableistung des Grundwehrdienstes
- 1975-1977 Berufstätigkeit als Krankenpfleger im
Städtischen Krankenhaus Kemperhof, Koblenz
- 1978-1984 Studium der Tiermedizin an der Ludwig-
Maximilians-Universität München
- 1984 22.10. Approbation als Tierarzt
- 1.11. Beginn der Dissertation am Institut
für Tierpathologie und Neuropathologie
(Professor Dr. E. Dahme) der Universität
München
- 1985 1.3.-30.11. Teilzeitanstellung als wissen-
schaftliche Hilfskraft am Institut für Tier-
pathologie der Universität München
- 1985-1986 Freie Forschungstätigkeit am Institut für
Tierpathologie und Neuropathologie der Uni-
versität München

